

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos**



**TESIS DOCTORAL**

**Calidad de la leche donada durante el procesamiento en un Banco de  
Leche Humana. Innovación en los procedimientos**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Diana Escuder Vieco**

Directores

Leónides Fernández Álvarez  
Carmen Rosa Pallás Alonso  
Irene Espinosa Martos

**Madrid, 2018**





**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y  
TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**



**CALIDAD DE LA LECHE DONADA DURANTE EL  
PROCESAMIENTO EN UN BANCO DE LECHE HUMANA.  
INNOVACIÓN EN LOS PROCEDIMIENTOS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Diana Escuder Vieco**

Bajo la dirección de los doctores

Leónides Fernández Álvarez  
Carmen Rosa Pallás Alonso  
Irene Espinosa Martos



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA  
Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



**CALIDAD DE LA LECHE DONADA DURANTE EL  
PROCESAMIENTO EN UN BANCO DE LECHE HUMANA.  
INNOVACIÓN EN LOS PROCEDIMIENTOS**

Memoria que para optar al grado de  
Doctor, presenta la Licenciada Diana  
Escuder Vieco

Madrid, 2017





Departamento de Nutrición, Bromatología  
y Tecnología de los Alimentos  
Facultad de Veterinaria

Ciudad Universitaria s/n. 28040 Madrid  
Teléfono: 91 394 3749. Fax: 91 394 3743

LEÓNIDES FERNÁNDEZ ÁLVAREZ, PROFESORA TITULAR DE UNIVERSIDAD, DEL DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, CARMEN ROSA PALLÁS ALONSO, PROFESORA ASOCIADA DE UNIVERSIDAD, DEL DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID E IRENE ESPINOSA MARTOS, INVESTIGADORA SENIOR EN PROBISEARCH S.L.

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “Calidad de la leche donada durante el procesamiento en un Banco de Leche Humana. Innovación en los procedimientos”, de la que es autora la Licenciada Diana Escuder Vieco, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección conjunta de los que suscriben, y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor.

Madrid, 5 de abril de 2017

Los Directores de la Tesis Doctoral,

Leónides Fernández Álvarez    Carmen Rosa Pallás Alonso    Irene Espinosa Martos



*A la memoria de mis abuelos*

*A mi familia*





Después de tantos años de trabajo, esfuerzo, superación personal e infinito aprendizaje llegó el momento de presentar mi tesis doctoral, un camino que no podría haber recorrido sin la ayuda de todos vosotros:

Gracias a mis tutoras de Tesis, porque sin su esfuerzo, enseñanzas y ejemplo para hacer las cosas correctamente no hubiera sido posible llegar hasta aquí. A Leo por su dedicación, sus palabras de cariño, por escuchar siempre mis preocupaciones, porque sea el problema que sea siempre encuentras la manera de resolverlo, por tu meticulosidad y por ser capaz de ver todo lo que al resto se nos escapa. A Irene por su paciencia, su constante ánimo y por todo el tiempo que me has dedicado en el laboratorio...quien me iba a decir a mí que iba a perder el miedo al Bioplex. A Keka por su total confianza en mí desde el principio, por darme la oportunidad de asomarme a la ciencia desde un punto de vista práctico y de aplicación clínica y por motivarme día a día.

A Juan Miguel por haberme dado la oportunidad de formar parte de vuestro equipo y enseñarme la necesidad de cuestionármelo todo en este mundillo de la investigación, gracias por compartir conmigo tus conocimientos, tus brillantes ideas, tus buenos consejos y por haberme ayudado en todo momento.

A mis chicas del Banco de Leche, Marisa, Victoria, Rosa, Celia y Mari Ángeles, muchas gracias por haberme ayudado a descongelar cientos de litros de leche, acudir ante inundaciones, válvulas rotas, alarmas que no cesan, congeladores desbordados... pero sobre todo gracias por sacarme siempre una sonrisa, por estar a mi lado cuando os he necesitado y cuando no también, por vuestra alegría y porque trabajar con vosotras es un placer.

A Antonio por el apoyo incondicional y desinteresado que siempre has mostrado conmigo, por tu curiosidad, por acompañarme en esas largas tardes de escritura de la patente y por todo lo que me has enseñado sobre ingeniería de fluidos.

A mis compañeros del hospital, Gerardo, Maite, Jesús, Carlos, María, Nadia, Sara, Clara, Noelia, Salva, Elena, Beatriz, Menchu, Ana, M<sup>a</sup> José, Rocío, Loli, Lidia, Esther y todas las enfermeras y auxiliares, que me han apoyado y ayudado durante todos estos años y con los que he compartido congresos, cursos, viajes y miles de experiencias dentro y fuera del servicio de neonatología que tanto me han enriquecido profesional y personalmente.

A todos los que forman parte de la Fundación de Investigación Biomédica del Hospital 12 de Octubre, Joaquín, Mar, Eva, Monte, Fernando, Javier, Sara, Elvira, Cristina y en especial a Mercedes por descubrirme el mundo de las patentes y todos sus entresijos. Al personal de la Biblioteca por ayudarme a encontrar aquellos artículos que parecían imposibles y, en general, a todos aquellos que pusieron su granito de arena en el hospital para hacer que el pasteurizador funcionara correctamente.

A mis compañeras de ProbiSearch y Universidad por integrarme en su ambiente de trabajo y compartir conmigo experimentos, risas y momentos inolvidables. A Esther por sus enseñanzas dentro y fuera del laboratorio. A Susana por sus palabras de ánimo y cariño. A Javi por ayudarme a hacer esos entretenidos campos de pulso. A Nivia por recordarme lo bonita que es mi tesis cuando más lo necesitaba. A Virginia por su disponibilidad. A Laura porque aún en la distancia siempre he recibido tu ayuda y consejo. A Rebeca porque sin ti la microbiología no

hubiera sido lo mismo. A Marina e Irma por su vitalidad y entusiasmo. A Lorena por los momentazos que hemos pasado juntas, ese mes de julio no lo olvidaré nunca. A mi Cris por tu ayuda durante estos últimos meses, tus mensajes a diario, por esas largas conversaciones que me devolvían las fuerzas para continuar y por lo fácil que ha sido conocerte y ser tu amiga.

A los profesores y alumnos que componen el Dpto. de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos por las divertidas conversaciones durante cafés y comidas y por todo el apoyo que me han dado para sacar adelante esta tesis.

A todos los profesionales de la empresa Sive Fluid System, especialmente a Pablo por haber confiado desde el principio en el proyecto del pasteurizador y, a Borja por ayudarme a resolver las miles de dudas y problemas que han ido surgiendo durante la puesta a punto de este equipo, ¡muchas gracias por hacer de este proyecto una realidad!

Gracias a Óscar García del Hospital del Mar y de Simona, Emilia, Roberta y Donatella del Istituto Superiore di Sanità de Roma por vuestra colaboración en los análisis de sustancias tóxicas. También quiero agradecer a Javier Fontecha y Nieves Corzo del CIAL por su participación en los análisis de ácidos grasos y carbohidratos.

Gracias a mi familia por haberme guiado y apoyado siempre para alcanzar mis metas. A mi madre a la que admiro por su fuerza y superación. A mi padre por inculcarme valores tan importantes como el esfuerzo y la pasión por el trabajo bien hecho. A mi hermano, por cuidarme siempre y haber sido un ejemplo a seguir. A mi prima por esa conexión especial que nos une y ese don que tiene para hacer bonito hasta lo más complejo, gracias por esta portada tan preciosa. A mis tíos por enseñarme lo importante que es la familia y a estar pendiente de ella.

A Javier por tu cariño, gran ayuda y apoyo constante, por escucharme, aconsejarme y compartir todos estos años con sus buenos y malos momentos, por creer en mí más que yo misma. Gracias por estar siempre a mi lado. A mi familia política por hacerme un hueco en su vida y darme siempre su cariño y apoyo.

A todos mis amigos con quienes he compartido alegrías y aflicciones. A Laura porque aunque Texas nos ha separado físicamente sé que siempre estás ahí para socorrerme y devolverme la ilusión. A mis “nutris” Irene, Ana, Rocío y Elena por su gran amistad y cariño desde que nos conocimos en la universidad. A Jesús por intentar contagiarme en todo momento con tu espíritu optimista y hacerme ver que nunca es tarde para asumir un nuevo reto. A mis amigos del cole, Remacha, David, Julián, Parra por los buenísimos momentos que hemos vivido y los que vendrán.

Quería también agradecer a la Red de Salud Materno Infantil y del Desarrollo (SAMID) y al Instituto de Salud Carlos III por conceder la financiación necesaria para hacer estos trabajos.

Por último, muchas gracias a todas las madres que de manera solidaria y altruista han donado su leche para poder realizar estos estudios.

## ÍNDICE

---



	Página
<b>I. RESUMEN / SUMMARY</b>	<b>1</b>
<b>II. EXPOSICIÓN GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR</b>	<b>7</b>
<b>III. INTRODUCCIÓN</b>	<b>13</b>
<b>III.1. Alimentación del recién nacido (RN) prematuro en una unidad de cuidados intensivos neonatales (UCIN)</b>	<b>15</b>
III.1.1. Opciones de alimentación para el RN prematuro	16
III.1.2. Leche de la propia madre	18
III.1.3. Leche donada	21
III.1.4. Fórmulas adaptadas	23
III.1.5. Fortificación de la leche humana	25
<b>III.2. Leche humana</b>	<b>27</b>
III.2.1. Definiciones	27
III.2.2. Leche de madres con RN prematuros	27
III.2.3. Composición microbiológica	30
III.2.3.1. Bacteriología de la leche humana	30
III.2.3.2. Origen de las bacterias aisladas en leche humana	33
III.2.3.3. Funciones de las bacterias de la leche humana	33
III.2.4. Composición bioquímica e inmunológica	34
<b>III.3. Leche donada</b>	<b>41</b>
III.3.1. Historia y situación actual de los bancos de leche	41
III.3.2. Banco Regional de la Comunidad de Madrid	45
III.3.3. Sistema de Gestión de la Calidad del Banco Regional de Leche Materna (BRLM)	48
III.3.3.1. Donación	52
III.3.3.1.1. Captación y selección de las donantes	52
III.3.3.1.2. Extracción, transporte y conservación de leche cruda	55
III.3.3.1.3. Plan de acreditación de centros satélites	59
III.3.3.2. Conservación y procesamiento	59
III.3.3.2.1. Controles de calidad de la leche donada antes de la pasteurización	59
III.3.3.2.2. Pasteurización y control de calidad de la leche pasteurizada	60
III.3.3.3. Distribución y trazabilidad de la leche donada pasteurizada	65
<b>III.4. Efectos de la pasteurización holder en la leche donada</b>	<b>67</b>
III.4.1. Efecto en la calidad microbiológica	68
III.4.2. Efecto en los componentes con actividad biológica	72
III.4.3. Efecto en la composición nutricional y bioquímica	73
<b>III.5. Nuevas alternativas para el tratamiento de la leche donada</b>	<b>76</b>
III.5.1. Pasteurización HTST	76
III.5.2. Pasteurización <i>flash heat</i>	78
III.5.3. Altas presiones hidrostáticas	79
III.5.4. Radiación ultravioleta (UV)	82

III.5.5. Termo-ultrasonicación	84
<b>IV. VALIDACIÓN DEL CUESTIONARIO DE UN BANCO DE LECHE PARA DETERMINAR LA PRESENCIA DE DROGAS ILEGALES, NICOTINA Y CAFEÍNA / VALIDATION OF A SCREENING QUESTIONNAIRE FOR A HUMAN MILK BANK TO DETERMINE THE PRESENCE OF ILLEGAL DRUGS, NICOTINE AND CAFFEINE</b>	<b>87</b>
IV.1. Abstract	89
IV.2. Introduction	89
IV.3. Methods	89
IV.4. Results	90
IV.5. Discussion	91
IV.6. References	92
<b>V. DETERMINACIÓN DE LA ACIDEZ EN LA LECHE DONADA: COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR DOS TÉCNICAS / DETERMINATION OF ACIDITY IN DONOR MILK: COMPARISON OF RESULTS OBTAINED BY 2 DIFFERENT ANALYTICAL METHODS</b>	<b>93</b>
V.1. Abstract	95
V.2. Background	95
V.3. Methods	96
V.4. Results	96
V.5. Discussion	96
V.6. Conclusion	97
V.7. References	97
<b>VI. DISEÑO Y VALIDACIÓN DE UN SISTEMA HTST PARA LA PASTEURIZACIÓN DE LECHE DONADA EN UN BANCO DE LECHE HUMANA / DESIGN AND VALIDATION OF A HTST SYSTEM FOR PASTEURIZATION OF DONOR MILK IN A HUMAN MILK BANK SETTING</b>	<b>99</b>
VI.1. Introduction	101
VI.2. Materials and Methods	105
VI.3. Results	109
VI.4. Discussion	115
VI.5. References	121
VI.6. Figures	127
VI.7. Tables	137

---

**VII. EFECTO DE LA PASTEURIZACIÓN HTST Y HOLDER EN LAS INMUNOGLOBULINAS, FACTORES DE CRECIMIENTO Y HORMONAS PRESENTES EN LA LECHE DONADA / EFFECT OF HTST AND HOLDER PASTEURIZATION ON IMMUNOGLOBULINS, GROWTH FACTORS AND HORMONES PRESENT IN DONOR MILK** **145**

---

VII.1. Introduction	147
VII.2. Materials and Methods	149
VII.3. Results	151
VII.4. Discussion	153
VII.5. References	159
VII.6. Figures	167
VII.7. Tables	173

**VIII. EFECTO DE LA PASTEURIZACIÓN HTST Y HOLDER EN LA COMPOSICIÓN NUTRICIONAL Y BIOQUÍMICA DE LA LECHE DONADA / EFFECT OF HTST AND HOLDER PASTEURIZATION ON NUTRITIONAL AND BIOCHEMICAL COMPOSITION OF DONOR HUMAN MILK** **177**

---

VIII.1. Introduction	179
VIII.2. Materials and Methods	181
VIII.3. Results	185
VIII.4. Discussion	189
VIII.5. References	195
VIII.6. Figures	203
VIII.7. Tables	209

**IX. DISCUSIÓN GENERAL** **231**

---

IX.1. Validación de un cuestionario de cribado de donantes de leches sobre consumo de drogas ilegales, nicotina y cafeína	233
IX.2. Mejora del control de calidad de la leche donada mediante la determinación de la acidez	237
IX.3. Adecuación de un equipo HTST a las necesidades reales de un banco de leche	239
IX.4. Efecto del tratamiento HTST sobre la composición microbiológica de la leche donada	243
IX.5. Efecto del tratamiento HTST sobre los compuestos con actividad biológica de la leche donada	249
IX.6. Efecto del tratamiento HTST sobre la composición bioquímica de la leche donada	257
IX.7. Análisis global de los cambios experimentados por la leche donada sometida a pasteurización Holder y tratamientos HTST	265
IX.8. Aplicabilidad práctica	271



---

<b>X. CONCLUSIONES</b>	<b>273</b>
------------------------	------------

---

<b>XI. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>277</b>
-------------------------	------------

---

<b>XII. ANEXOS</b>	<b>307</b>
--------------------	------------

---

XII.1. Criterios de exclusión temporal para las donantes de leche del BRLM	309
XII.2. Criterios de exclusión definitiva para las donantes de leche del BRLM	311
XII.3. Diagrama de flujo para la acreditación de centros satélite para la recepción de leche donada. Fase I.	313
XII.4. Diagrama de flujo para la acreditación de centros satélite para la captación y aceptación de donantes. Fase II.	314
XII.5. Listado de figuras	315
XII.6. Listado de tablas	317
XII.7. Listado de abreviaturas	318

**I.**

**RESUMEN**

---

**SUMMARY**



## I. RESUMEN

La leche humana no es solo una simple fuente de nutrientes para el recién nacido sino una compleja y singular mezcla de sustancias con actividad biológica esenciales para el desarrollo del neonato. La leche de la propia madre proporciona en cada momento los nutrientes que mejor se adaptan a las necesidades del recién nacido. Cuando no se dispone de leche de la propia madre o no es suficiente para satisfacer las necesidades nutricionales de los niños prematuros, situación que es frecuente en las Unidades de Cuidados Intensivos Neonatales, la mejor alternativa es el uso de leche donada, que debe ser gestionada a través de los bancos de leche para que los prematuros puedan disfrutar de las ventajas de la leche humana.

El proceso de donación de leche se inicia con una selección de las potenciales donantes para comprobar que gozan de un buen estado de salud y un estilo de vida saludable. En esta selección se incluye un análisis de sangre y un cuestionario sobre los hábitos de vida. Posteriormente, se realiza un control de la calidad de la leche que entregan las donantes, para asegurar que ha sido obtenida y manipulada adecuadamente. En tal caso, la leche donada se pasteuriza, siendo el método Holder (62,5°C, 30 minutos) el que se emplea de forma generalizada en los bancos de leche. Este método ofrece un equilibrio aceptable entre la seguridad microbiológica y la calidad nutritiva de la leche a pesar de que reduce o anula la actividad de algunos de los componentes con actividad biológica. Recientemente, se ha propuesto como alternativa la pasteurización a alta temperatura y corto tiempo (HTST, del inglés *High-Temperature Short-Time*) para preservar la seguridad microbiológica y, simultáneamente, reducir el impacto del tratamiento térmico sobre los componentes nutricionales y biológicos de la leche donada. Sin embargo, no hay equipos disponibles para realizar este tratamiento en las condiciones reales de un banco de leche.

En este contexto, uno de los primeros objetivos de esta Tesis Doctoral fue validar el cuestionario sobre el estado de salud y los hábitos de vida que han de completar las potenciales donantes de leche materna en cuanto al consumo de drogas lícitas e ilícitas y cafeína que puedan conducir a la presencia de sustancias no deseables en la leche. Los resultados obtenidos confirman que dicho cuestionario permite descartar el posible uso de drogas ilícitas. Sin embargo, no contempla la exposición involuntaria al humo del tabaco o el consumo detallado de bebidas con cafeína.

También se ha estudiado la relación existente entre el pH y la acidez Dornic de la leche donada, un parámetro que se determina habitualmente antes de iniciar su procesamiento. En base a los resultados obtenidos, se ha establecido como criterio de aceptación de la leche donada cruda un valor de  $\text{pH} > 6,57$  (equivalente a 8° Dornic).

Además, se ha diseñado un equipo para la pasteurización de la leche donada según la modalidad HTST, mediante un proceso en continuo y empleando

temperaturas más altas y tiempos más cortos que la pasteurización Holder. Este equipo cumple con todos los requisitos necesarios para su operación en un banco de leche porque permite procesar de forma rápida, continua, controlada y reproducible volúmenes variables de leche donada en función de las necesidades del banco.

A continuación, y empleando las condiciones de operación del banco de leche, se evaluó la calidad microbiológica de la leche procesada en el pasteurizador HTST empleando distintas combinaciones de temperatura (70, 72, 75°C) y tiempo de tratamiento (5, 10, 15, 20 y 25 segundos) y se comparó con la de la leche pasteurizada por el método Holder. De las bacterias presentes inicialmente en la leche donada, los géneros más termorresistentes fueron *Enterococcus* y *Bacillus*. La pasteurización HTST destruye eficazmente todas las formas vegetativas de los microorganismos presentes inicialmente pero no las formas esporuladas de *Bacillus* sp. La determinación de las concentraciones de furosin y lactulosa indican que el daño térmico derivado de este tratamiento es menor que el originado por la pasteurización Holder.

Así mismo, al estudiar la destrucción de distintos componentes con actividad biológica presentes en la leche cruda donada se comprobó que el porcentaje de retención de las inmunoglobulinas A, M y G, el factor de crecimiento transformante  $\beta_2$  y la leptina era mayor tras el tratamiento HTST que cuando la leche se trató con el método Holder. También se estudió el efecto en el valor nutritivo de la leche, evaluando los cambios producidos en los macronutrientes y en distintos micronutrientes. Globalmente, no se observaron cambios significativos en la grasa, la lactosa, las proteínas, el *mio*-inositol, el perfil de ácidos grasos y las vitaminas de la leche como consecuencia del tratamiento HTST.

El análisis multivariado exploratorio de los resultados obtenidos con un total de 40 variables estudiadas en 10 lotes de leche donada sometidos a pasteurización Holder y un tratamiento HTST (3 lotes de 70°C, 4 lotes de 72°C y 3 lotes de 75°C) durante 5 a 25 segundos permite concluir que el efecto global del tratamiento a 75°C es similar a la pasteurización Holder y diferente de los tratamientos HTST a 72°C y 70°C, que son más suaves. Globalmente, las características (variaciones en la composición y/o en la actividad biológica) de la leche pasteurizada con un tratamiento HTST a 70 o 72°C están más próximas a las características de la leche cruda donada que cuando se emplea un tratamiento a 75°C o la pasteurización Holder.

A la vista de los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, el procesamiento HTST a 72°C durante 15 segundos logra los objetivos de seguridad microbiológica necesarios para distribuir la leche a niños prematuros y/o enfermos, al tiempo que su impacto sobre un gran número de compuestos con actividad biológica es menor que el ejercido por el método Holder.

## SUMMARY

Human milk is not only a simple source of nutrients for the newborn but a complex and unique mixture of substances having biological activities that are essential for his/her development. Own's mother milk provides the nutrients that best fit the needs of the growing infant. When it is unavailable, or in short supply to meet the nutritional requirements of the preterm infant, a fact that is common in Neonatal Intensive Care Units, the best alternative is the use of donor human milk. Donor milk is managed through milk banks, so premature babies can enjoy the benefits of human milk.

To guarantee that donor milk delivered to preterm infants is safe, potential donors are screened to ensure they are in good health and maintain a healthy lifestyle. This selection includes a blood test and a questionnaire on lifestyle habits. Milk provided by the donors is subjected to quality controls to ensure that it has been properly obtained and handled. Subsequently, donor milk is pasteurized. Nowadays, the Holder method (62.5°C, 30 minutes) is the most common milk pasteurization method used in milk banks worldwide because the pasteurized milk has an appropriate balance between microbiological safety and nutritional quality. However, undesirable changes may occur, including the destruction or reduction of the biological activity of some biologically active milk compounds. Recently, high-temperature short-time (HTST) pasteurization has been proposed as an alternative for a better preservation of the nutritional and biological components of donor milk. However, there is no equipment available to perform this treatment under the actual conditions of a milk bank.

For this reason, one of the first objectives of this PhD Thesis was to validate the questionnaire on health status and lifestyle habits to be completed by potential donors of milk in terms of the consumption of licit and illicit drugs and certain foods and beverages which may lead to the presence of unsuitable substances in milk. The obtained results suggest that this questionnaire allows to discard the possible use of illicit drugs. However, it does not cover neither involuntary exposure to tobacco smoke nor a detailed consumption of caffeinated beverages.

The relationship between pH and Dornic acidity in donor milk has also been studied. Milk acidity is a parameter that is routinely determined during the quality control of the donor milk and before processing. Based on the results obtained in this PhD Thesis, a value of  $\text{pH} > 6.57$ , equivalent to 8° Dornic, has been established as an acceptance criterion for raw donor milk.

In addition, a HTST pasteurizer has been designed for the continuous processing of donor milk using higher temperatures and shorter times than Holder pasteurization. This equipment fulfills all the necessary requirements for its operation in a milk bank because it allows the processing of variable volumes of donor milk (according to the needs of the milk bank) in a fast, continuous, controlled and reproducible way.

Then, the microbiological quality of donor milk was evaluated after HTST treatment using different temperature (70, 72, 75°C) and treatment time (5, 10, 15, 20 and 25 seconds) combinations and compared to the results obtained after Holder pasteurization. Among bacteria present initially in donor milk, the most resistant genera were *Enterococcus* and *Bacillus*. HTST pasteurization efficiently destroyed all vegetative forms of the microorganisms present initially in donor but not sporulated *Bacillus* sp. Furosine and lactulose concentrations in HTST-treated donor milk indicates that the thermal damage due to this heat treatment is lower than that caused by Holder pasteurization.

The destruction of milk compounds with biological activity after HTST treatment was also evaluated. It was found that the concentrations of immunoglobulins A, M and G, transforming growth factor  $\beta$ 2 and leptin were higher than those registered with the Holder method. The effect on the milk nutritive value was also studied, after evaluating the changes in macronutrients and different micronutrients. Overall, no significant changes were observed in fat, lactose, proteins, *myo*-inositol, fatty acid profile and milk vitamins in donor milk as a result of HTST treatment.

A multivariate exploratory analysis was performed including a total of 40 variables studied in 10 processing lots of donor milk after both Holder pasteurization and HTST treatment (3 lots at 70°C, 4 lots at 72°C and 3 lots at 75°C) for 5 to 25 seconds. The obtained results allow to conclude that the overall effect of HTST treatment at 75°C is similar to that of Holder pasteurization. In addition, the changes associated to this HTST treatment at 75°C differed from those obtained after HTST treatments at 72°C and 70°C, which were milder. Overall, characteristics (changes in composition and/or biological activity) of donor milk processed using an HTST treatment at 70 or 72°C are closer to the characteristics of raw donor milk compared to HTST-treated milk at 75°C or Holder pasteurized.

In view of the results obtained in this PhD thesis, HTST processing of donor milk at 72°C for 15 seconds achieves the microbiological safety objectives necessary to distribute milk to preterm and/or sick infants, while its impact on a large number of compounds with biological activity is lower than donor milk after Holder pasteurization.

## **II. EXPOSICIÓN GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR**

---





La leche humana no es solo una simple fuente de nutrientes para el recién nacido sino una compleja y singular mezcla de sustancias con actividad biológica esenciales para el desarrollo del neonato (Lönnerdal, 2017). El beneficio que aporta la leche materna a los prematuros es, si cabe, aún mayor puesto que reduce significativamente el riesgo de intolerancia digestiva, enterocolitis necrotizante, sepsis de aparición tardía, displasia broncopulmonar y retinopatía asociada a la prematuridad (Kim, 2016). Además, también tiene otros beneficios a medio y largo plazo como, por ejemplo, un mejor desarrollo cognitivo y una mejor salud cardiovascular y metabólica. De hecho, la alimentación con leche humana se considera una de las intervenciones más sencillas y eficaces para promover la salud a lo largo de la vida (Underwood, 2016).

Cuando se desencadena un parto prematuro es habitual que las madres tarden un tiempo en empezar a producir el calostro y, cuando esto ocurre, a veces no es suficiente para cubrir las necesidades energéticas y nutritivas que requiere el recién nacido. En tales casos, la leche donada por otras madres, y gestionada a través de los bancos de leche, es una excelente opción para que los prematuros puedan disfrutar de las ventajas de la leche humana (ESPGHAN *et al.*, 2013).

Una de las prioridades de los bancos de leche es garantizar que la leche donada que se suministra a los prematuros es segura (Hartmann, 2017). Por ello, resulta fundamental seleccionar donantes sanas y que tengan un estilo de vida saludable. Antes de que una mujer empiece a donar su leche se debe realizar un análisis de sangre para descartar la presencia de ciertas enfermedades transmisibles y debe cumplimentar una encuesta en la que se recoge información sobre el posible consumo de drogas lícitas e ilícitas y de ciertos alimentos y bebidas que puedan conducir a la presencia de sustancias indeseables en la leche.

Tras la firma del consentimiento informado, la leche donada y entregada en el banco de leche debe someterse a varios controles para comprobar que ha sido extraída y manejada en condiciones higiénicas, antes de ser tratada térmicamente. La determinación de la acidez es uno de los controles que nos pueden indicar si la leche ha sido manipulada adecuadamente (Vázquez-Román *et al.*, 2013). Si ha habido un abuso de temperatura, las bacterias transforman la lactosa en ácido láctico y provocan un aumento de la acidez, que reduce la calidad nutricional y tecnológica de la leche donada. No obstante, los métodos habituales para medir la acidez de la leche, como el método Dornic, tienen varios inconvenientes, incluyendo su subjetividad y baja precisión.

La leche donada que ha superado el control de calidad es sometida a un tratamiento térmico para destruir los microorganismos que pudieran provocar una infección en los prematuros. Actualmente, el tratamiento térmico al que se somete la

leche donada en la mayor parte de los bancos de leche es la pasteurización Holder, que requiere calentar la leche a 62,5°C y mantenerla a esa temperatura durante 30 minutos.

A pesar de garantizar la seguridad microbiológica de la leche donada, este tratamiento tiene el inconveniente de destruir o disminuir significativamente la concentración de algunos de los componentes con actividad biológica, incluyendo algunas inmunoglobulinas, citoquinas, factores de crecimiento, hormonas y enzimas (Peila *et al.*, 2016); en consecuencia, limita el beneficio que la leche humana aporta al prematuro.

En la industria alimentaria el empleo de la pasteurización Holder es marginal, aplicándose en su lugar un tratamiento térmico equivalente en cuanto a destrucción de microorganismos pero mucho más respetuoso con esos compuestos que son sensibles al calor. Se trata de la pasteurización HTST (por sus siglas en inglés, *High-Temperature Short-Time*) que consiste en calentar la leche a una temperatura superior (72-75°C) durante un tiempo mucho menor (15-30 segundos). Sin embargo, los equipos disponibles para la industria láctea han sido diseñados para el procesamiento de grandes volúmenes de leche, mientras que los pocos equipos diseñados para estudiar el efecto de los tratamientos HTST en la leche humana son adecuados para realizar ensayos en el laboratorio pero no para su uso en un banco de leche, a pesar de que los resultados obtenidos con tales equipos hayan sido muy prometedores (Picaud y Buffin, 2016).

A la vista de todo lo expuesto anteriormente, los objetivos de esta Tesis Doctoral han sido los siguientes:

1. Validar el cuestionario sobre el estado de salud y los hábitos de vida que han de completar las potenciales donantes de leche materna en cuanto al consumo de drogas lícitas e ilícitas y de ciertos alimentos y bebidas que puedan conducir a la presencia de sustancias no adecuadas en la leche.

2. Establecer la relación existente entre el pH y la acidez Dornic para determinar su utilidad como parámetro en el control de calidad de la leche donada antes de iniciar su procesamiento.

3. Diseñar un equipo para la pasteurización de la leche donada según la modalidad HTST mediante un proceso en continuo, empleando temperaturas más altas y tiempos más cortos que la pasteurización Holder (62,5°C durante 30 minutos), que cumpla con los requisitos necesarios para su operación en un banco de leche y que esté adaptado a las necesidades del mismo.

4. Evaluar la calidad microbiológica de la leche donada procesada en el pasteurizador HTST empleando distintas combinaciones de temperatura (70, 72, 75°C) y tiempo de tratamiento (5, 10, 15, 20, 25 segundos) y compararla con la de la leche

pasteurizada por el método Holder. Analizar la pérdida de actividad de las enzimas empleadas habitualmente como indicadores de este tratamiento térmico y el contenido de furosina y lactulosa como indicadores de calidad en leche procesada térmicamente.

5. Determinar el efecto del calentamiento HTST empleando distintas combinaciones de temperatura (70, 72, 75°C) y tiempo de tratamiento (5, 10, 15, 20, 25 segundos) en la destrucción de distintos componentes con actividad biológica, como inmunoglobulinas, factores de crecimiento y hormonas, presentes en la leche cruda donada y compararlo con el producido por el método Holder.

6. Comprobar los cambios producidos en el valor nutritivo (grasa, lactosa, proteínas, perfil lipídico y vitaminas) de la leche donada como consecuencia de su tratamiento HTST empleando distintas combinaciones de temperatura (70, 72, 75°C) y tiempo (5, 10, 15, 20 25 segundos) y compararlos con los derivados de la pasteurización Holder.



### **III.**

### **INTRODUCCIÓN**

---



### III.1. ALIMENTACIÓN DEL RECIÉN NACIDO (RN) PREMATURO EN UNA UNIDAD DE CUIDADOS INTENSIVOS NEONATALES (UCIN)

La duración del embarazo se considera normal cuando el parto se produce entre las 37 y 41 semanas y 6 días de gestación (“parto a término”). Cuando el niño nace antes de las 37 semanas completas de gestación se le denomina “premature” o “pretérmino” (OMS, 1985). En general, los órganos y sistemas (respiración, control de temperatura, digestión, metabolismo, etc.) del niño prematuro son inmaduros en comparación con los del niño a término. Por ello, los niños prematuros en muchas ocasiones necesitan apoyo adicional para sobrevivir fuera del útero materno y, los más inmaduros suelen ingresar en unidades de cuidados intensivos neonatales (UCIN).

Según su edad gestacional (EG), los niños prematuros se clasifican en varios grupos (McCormick *et al.*, 2011):

- (a) Prematuros moderados o tardíos: aquellos nacidos entre las 32 y 36 semanas y 6 días
- (b) Muy prematuros: aquellos nacidos entre las 28 y 32 semanas
- (c) Extremadamente prematuros: los nacidos antes de las 28 semanas

Otro parámetro que se utiliza habitualmente para clasificar a estos niños es su peso al nacimiento (PN), existiendo prematuros cuyo PN es bajo (<2.500 g), muy bajo (<1.500 g) o extremadamente bajo (<1.000 g). La gravedad de los problemas que presentan estos niños suele ser mayor cuanto menores son la EG y el PN, por lo que ambos parámetros son relevantes en la práctica. Conviene señalar que el PN es un indicador del correcto desarrollo fetal, cuyo valor óptimo se establece dependiendo de su edad gestacional. En este sentido, la población de RN prematuros es muy heterogénea y, en consecuencia, las necesidades nutricionales entre este colectivo son muy variadas.

Cuando un RN nace prematuramente, el aporte de nutrientes que sustenta su crecimiento durante su vida intrauterina se ve bruscamente interrumpido. Actualmente se acepta que este aporte se debe restaurar lo antes posible para conseguir un crecimiento lo más próximo posible al crecimiento fetal durante el período hospitalario y optimizar su crecimiento y niveles de neurodesarrollo a largo plazo (Cleminson *et al.*, 2016). Aunque existen métodos para estimar el gasto calórico y las necesidades energéticas del RN y, de esta forma, poder estimar sus necesidades nutricionales, en la práctica clínica los parámetros nutricionales de peso, longitud y perímetro cefálico continúan siendo los de elección en la programación de su nutrición durante la estancia hospitalaria (Tremblay *et al.*, 2016).



Diversas intervenciones nutricionales tempranas (nutrición parenteral precoz, nutrición enteral trófica, fortificación) tienen el objetivo de evitar la subnutrición y disminuir el número de pacientes con peso, longitud y perímetro cefálico por debajo de los valores esperados para su edad corregida, así como acortar la estancia hospitalaria. Estas medidas, aunque tienen una amplia variabilidad interpersonal e intercentros (Kim, 2016), deben contar con un soporte nutricional adecuado durante todo el periodo de crecimiento compensatorio, dado que el primer año de vida es clave para la recuperación nutricional.

Después de nacer, los niños prematuros pueden ganar 15-20 g/kg/día, siendo estos valores similares a los del feto *in utero*. Pero este aumento de peso es difícil de conseguir durante las primeras semanas de vida y, por lo general, no se logra hasta unas semanas después del nacimiento (Fanaro, 2010). Esto contribuye a que, aunque la mayoría de los prematuros al nacer tienen un peso acorde con su edad gestacional, al abandonar el hospital suelen tener un peso inferior al percentil 10 para su edad. Esta subnutrición puede ser consecuencia tanto de un aporte nutricional insuficiente como de complicaciones que incrementan los requerimientos nutricionales y que, a la larga, pueden ocasionar problemas neurológicos y metabólicos (Ehrenkranz, 2010). En este sentido, un RN con un peso inferior a 1 kg tiene tan sólo un 1% de grasa, un 8% de proteína y una reserva calórica no proteica de 110 kcal/kg, lo que es insuficiente para mantener las necesidades basales durante los primeros 4 días de vida. Si a esto se añade una insuficiencia respiratoria o una sepsis, el consumo metabólico es mucho mayor y estas reservas se agotan mucho antes (Monasterolo *et al.*, 2013). Por ello, el manejo nutricional de estos niños prematuro afecta a su morbilidad a corto, medio y largo plazo (Brennan *et al.*, 2016).

### **III.1.1. Opciones de alimentación para el RN prematuro**

La progresión del RN muy prematuro hasta llegar a alimentarse completamente a través del pecho de su propia madre pasa por una serie de etapas en las que se pueden utilizar diferentes formas de nutrición: parenteral, enteral y oral.

La nutrición parenteral es necesaria en aquellos niños en los que la alimentación enteral pueda estar contraindicada debido a su inmadurez o por algún problema médico. Consiste en la administración por vía intravenosa de una solución de glucosa y aminoácidos con electrolitos, minerales y vitaminas, además de grasas como principal fuente de energía no proteica. Las soluciones se preparan normalmente en una farmacia especializada para reducir al mínimo el riesgo de contaminación microbiana, dado que la bacteriemia es la complicación más común de la nutrición parenteral. Además, tanto con las vías centrales como con las periféricas, hay que tener cuidado con las lesiones por extravasación. La infiltración subcutánea de una solución hipertónica e irritante puede causar ulceración local de la piel, infección secundaria y cicatrización (Patel y Bathia, 2016).

La nutrición enteral se refiere a la administración intragástrica de cualquier líquido o alimento a través de una sonda que pasa, a través de la nariz o la boca, directamente al estómago. Esta técnica se aplica habitualmente en los RNs de menos de 32 semanas, pero se puede extender hasta las 34-35 semanas, dependiendo del estado de desarrollo. La sonda nasogástrica (SNG) se utiliza más que la orogástrica en los menores de 32 semanas porque su fijación y mantenimiento son más fáciles. No obstante, las SNG ocluyen parcial o totalmente un orificio nasal y aumentan la resistencia de las vías aéreas superiores así como el riesgo de desaturación y apnea (Edmond y Bahl, 2008). Por ello, no es conveniente su utilización en los prematuros que tienen una función respiratoria alterada.

Dado que los RN prematuros con menos de 32 semanas de gestación no suelen tolerar la alimentación enteral en los primeros días de vida, la práctica habitual durante muchos años ha sido no iniciar dicha alimentación en la primera semana de vida. Sin embargo, se ha observado que los prematuros que reciben pequeñas cantidades de leche (de 5 a 20 mL/kg/día) desde el primer día desarrollan un tránsito intestinal más rápido y patrones de motilidad intestinal normales en menor tiempo. Esto se traduce en mejor tolerancia digestiva y un menor tiempo para alcanzar la nutrición enteral completa (Edmond y Bahl, 2008; Greene *et al.*, 2016; Mosqueda *et al.*, 2008). A esta alimentación mínima se la conoce también como alimentación “trófica” para el intestino.

La administración intragástrica puede ser fraccionada (generalmente por gravedad o regulada a través de una bomba de jeringa) o continua (en 3-4 horas a través de una bomba de jeringa) (Dani *et al.*, 2013). No es conveniente que la alimentación continua se mantenga más de 4 horas porque los lípidos se adhieren a las paredes del tubo, disminuyendo su aporte (Igawa *et al.*, 2014; Rayyan *et al.*, 2015). Al comparar ambas técnicas, no se han encontrado diferencias en el periodo de tiempo necesario para alcanzar la alimentación enteral completa en los prematuros (Rövekamp-Abels *et al.*, 2015). Sin embargo, en la alimentación fraccionada, es importante considerar el tiempo de administración del alimento por gravedad (en bolo) ya que la capacidad gástrica de los prematuros es limitada y el vaciado gástrico es lento. Cuando se alcanza la cantidad máxima de aporte enteral, la administración rápida puede producir distensión gástrica, dificultad respiratoria, regurgitación y, en ocasiones, apnea. En estos casos es preferible administrar el bolo en un tiempo más fisiológico, similar a la duración de una toma, es decir, unos 20-30 minutos.

En general se acepta que incrementos de hasta 20 mL/kg/día son seguros con cualquier tipo de leche. Sin embargo, la práctica común con leche humana es incrementar hasta 30 mL/kg/día en prematuros estables, hasta alcanzar la alimentación enteral completa. En la fase de aumento del aporte enteral, al igual que cuando se ha alcanzado la alimentación enteral completa, debe vigilarse si aparecen signos de

intolerancia como distensión abdominal o vómitos (especialmente si son biliosos o sanguinolentos).

### III.1.2. Leche de la propia madre

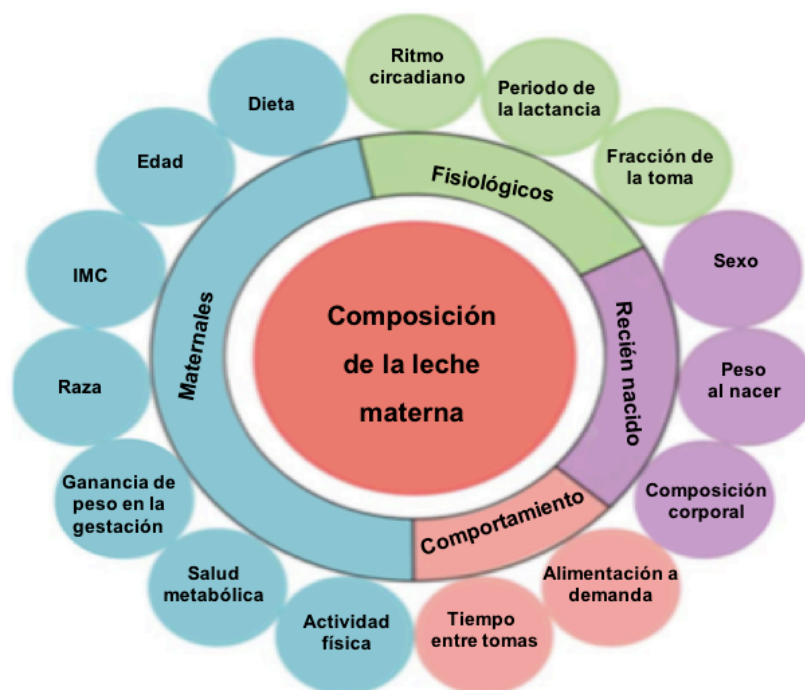
En 2002, la OMS cita textualmente la siguiente recomendación “*la lactancia materna es la mejor manera de proporcionar alimento para el crecimiento y desarrollo sano de los niños; es también una parte integral del proceso reproductivo con importantes implicaciones para la salud de las madres. Como recomendación de salud pública mundial, los lactantes deben ser amamantados exclusivamente durante los primeros seis meses de vida para lograr un crecimiento, desarrollo y salud óptimos. A partir de entonces, para satisfacer sus necesidades nutricionales, los lactantes deben recibir alimentos complementarios nutricionalmente adecuados y seguros, mientras que la lactancia continúa hasta los dos años de edad o más. La lactancia materna exclusiva desde el nacimiento es posible excepto por algunas condiciones médicas, y la lactancia materna exclusiva sin restricciones da lugar a una producción de leche abundante*”. (OMS, 2002). En 2005, la Academia Americana de Pediatría (AAP) reafirma esta recomendación de alimentación en el RN y la actualiza en el 2012 (AAP, 2012).

La leche materna es un fluido biológico, extremadamente complejo, producido por mujeres con genotipos, fenotipos y dietas que varían notablemente. En consecuencia, la composición de la leche materna se ve afectada por multitud de factores maternos, ambientales o en relación con el RN como son, entre otros, la edad gestacional, el periodo de lactancia, el ritmo circadiano o la fracción de la toma (Figura 1) (Fields *et al.*, 2016).

Actualmente existe evidencia sólida que demuestra que la leche materna (fortificada cuando sea necesario) es la mejor opción de alimentación para el RN, especialmente cuando se trata de niños prematuros o enfermos. Para este grupo los beneficios antiinfecciosos, inmunológicos, neurológicos, emocionales y económicos de la leche materna adquieren especial relevancia (Agostoni *et al.*, 2009; Eidelman, 2012; Lee *et al.*, 2012; Schanler, 2007; Schanler, 2011; Wight *et al.*, 2008)

Los beneficios de la leche materna para los niños prematuros incluyen un vaciado gástrico más rápido (Ewer y Yu, 1996; Schanler *et al.*, 1999), una tolerancia más rápida a la alimentación enteral y una reducción de la necesidad de nutrición parenteral (Schanler, 2000), un mejor desarrollo neurológico y cognitivo (Schneider and García, 2017), la reducción de la incidencia de enterocolitis necrotizante (NEC), retinopatía del prematuro, sepsis y otras infecciones (Bharwani *et al.*, 2016; Cacho *et al.*, 2017), menor riesgo de broncodisplasia pulmonar (Dicky *et al.*, 2017) y tiempos de hospitalización más cortos (Healy *et al.*, 2016). Probablemente, estos efectos sean debidos a la acción combinada de los nutrientes y una variedad de factores bioactivos presentes en el calostro y la leche materna, tales como inmunoglobulinas (Ig), células inmunocompetentes, ácidos grasos antimicrobianos, oligosacáridos, lisozima,

lactoferrina y otras glicoproteínas, péptidos antimicrobianos y bacterias comensales y potencialmente probióticas (Lewis *et al.*, 2017; Fernandez *et al.*, 2013).



**Figura 1.** Factores que afectan a la composición de la leche materna. IMC, índice de masa corporal. Fuente: Adaptado de Fields *et al.* (2016).

En las madres de niños prematuros, el establecimiento de la lactancia suele complicarse, especialmente cuando la EG es inferior a las 28 semanas. En estos casos, la producción de leche puede ser insuficiente debido al desarrollo incompleto de la mama cuando termina la gestación. Por otra parte, cuando el prematuro está preparado para iniciar la alimentación oral, el hábito a la extracción con bomba puede dificultar la eyección de leche ante la débil succión del RN. Estas complicaciones normalmente se asocian con una menor duración de la lactancia en este grupo de madres (Meier *et al.*, 2017).

Entre las medidas para la promoción y el soporte de la lactancia materna en madres de niños prematuros, destacan las siguientes:

(a) Participación de los padres en los cuidados. La participación continua de los padres en los cuidados en la UCIN mejora la tasa de lactancia materna y acorta la estancia hospitalaria (Giannì *et al.*, 2016).

(b) Método de la madre canguro. Se puede definir como el contacto piel con piel entre la madre y el RN prematuro lo más precoz, continuo y prolongado posible con lactancia materna (Chan *et al.*, 2016). Este es un sistema aconsejable para prematuros de cualquier EG, peso y tipo de enfermedad, mientras sea tolerado por la pareja madre-hijo y por la UCIN. Entre las ventajas de este método se incluye una mayor tasa de lactancia materna, un apego más rápido, una mejor regulación de la temperatura del niño, una disminución del estrés en el neonato y la madre, así como una menor incidencia de infecciones y de morbilidad en los prematuros (Sharma *et al.*, 2017; Conde-Agudelo *et al.*, 2016)

(c) Succión no nutritiva. La succión del pecho vacío, tras la extracción de leche, puede favorecer la lactancia materna al alta.

(d) Consejos sobre lactancia y apoyo continuado, tanto en el hospital como en el domicilio.

(e) Alta precoz. En España, y en otros países, se tiene ya una amplia experiencia con los programas de alta precoz con apoyo en domicilio. Se suele recomendar a RNs prematuros estables, y con menos de 2.000-2.200 g y capaces de alimentarse por vía oral. Estos programas son seguros y muy satisfactorios para los padres y los niños (Lundberg *et al.*, 2016).

Incluso cuando la lactancia se establece sin problemas, a veces es necesario que la mujer se extraiga la leche y se conserve hasta la administración a su hijo. El manejo de la leche materna tanto en el domicilio de la madre como en las unidades neonatales adquiere especial relevancia ya que este fluido biológico puede contaminarse o perder parte de sus componentes nutricionales o biológicos como consecuencia de la extracción o almacenamiento en malas condiciones (Peters *et al.*, 2016).

La extracción generalmente se lleva a cabo mediante el uso de bombas mecánicas. Estos aparatos constan de varias piezas y su diseño no permite, en la actualidad, que el tratamiento de esterilización sea totalmente efectivo, por lo que es frecuente que la leche se altere microbiológicamente. Entre los grupos bacterianos asociados al uso de las bombas extractoras destacan diversos representantes de la familia *Enterobacteriaceae* y algunas otras bacterias Gram-negativas (Boo *et al.*, 2001). El almacenamiento en refrigeración hasta un máximo de 96 horas parece ser un método apropiado para mantener las propiedades nutritivas de la leche. Sin embargo, los componentes celulares y las Igs pueden disminuir considerablemente si las condiciones de conservación no son las adecuadas (Ballard y Morrow, 2013). La congelación afecta a ciertos componentes protectores como la lisozima (se reduce hasta el 40%), la lactoferrina (11%) y la IgA (8%) (Chang *et al.*, 2013).

Desde 2009, en el Servicio de Neonatología del Hospital 12 de Octubre se estableció una vía clínica para la extracción, conservación y administración de leche de

la propia madre que tenía como objetivo garantizar que las madres que deseen dar la leche extraída a sus hijos ingresados puedan hacerlo de forma segura, con apoyo e información y evitando, en la medida de lo posible, la pérdida de su calidad nutritiva y biológica (Figura 2).

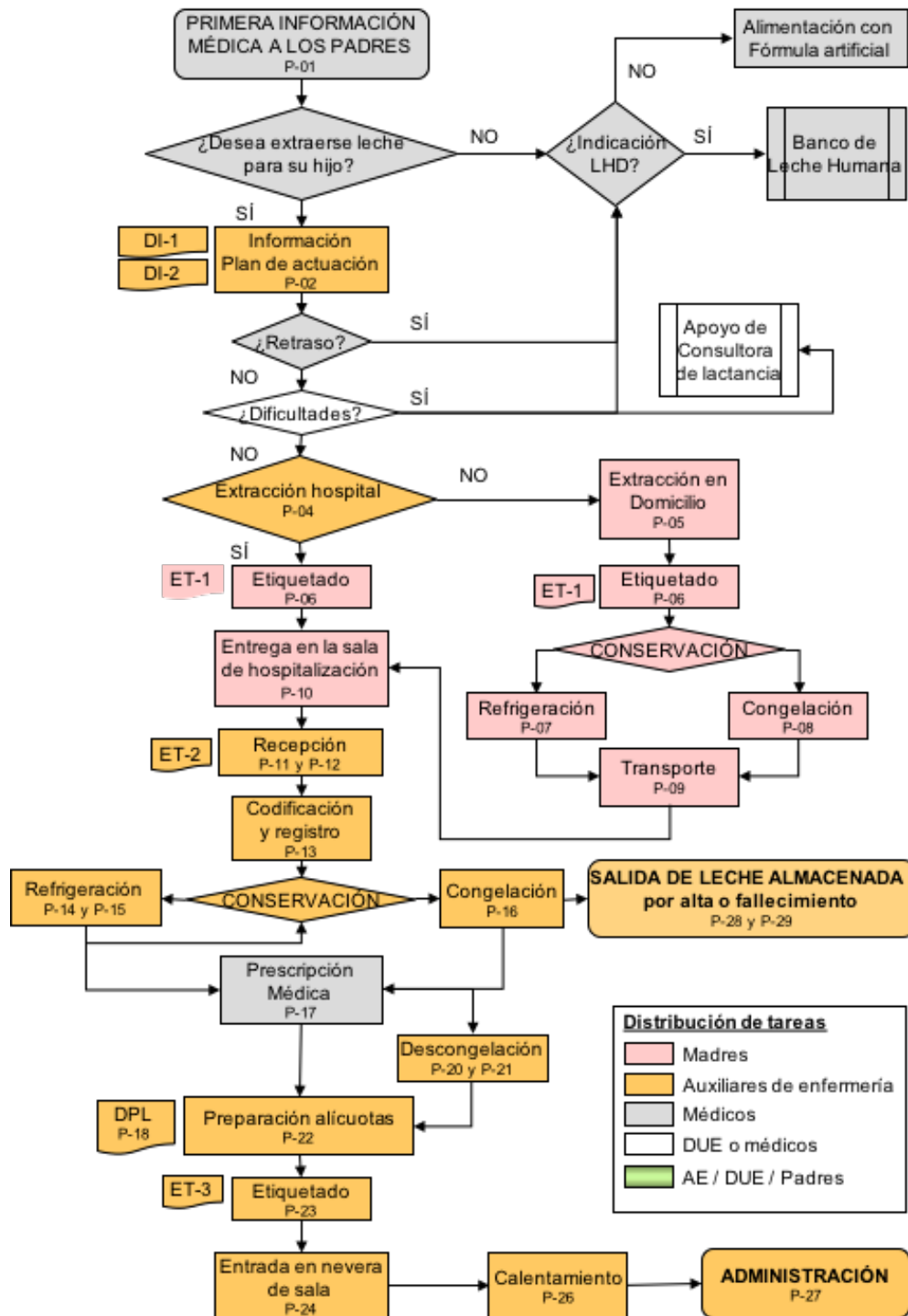
### III.1.3. Leche donada

La leche donada por mujeres lactantes sanas y pasteurizada en un Banco de Leche es la siguiente mejor alternativa si, por cualquier motivo, no se dispone de leche de la propia madre (WHO, 2015; ESPGHAN Committee on Nutrition *et al.*, 2013).

La leche donada no está considerada dentro de la Ley de células y tejidos humanos (Real Decreto 9/2014, de 4 de julio). Tampoco se considera un medicamento ni un producto sanitario. No hay legislación internacional al respecto, a excepción de Francia donde el uso de leche materna está regulado (L.2323-1, 2007) Además, en general, ni siquiera existe un consenso sobre su procesamiento en los bancos de leche; sólo se dispone de las guías de actuación editadas por las distintas asociaciones de bancos de leche a nivel mundial.

A corto plazo, los RNs alimentados con leche donada presentan una menor incidencia de NEC (Boyd *et al.*, 2007; McGuire y Anthony, 2003; Quigley y McGuire, 2014; Shulhan *et al.*, 2017) e infección nosocomial (Corpeleijn *et al.*, 2016; de Silva *et al.*, 2004; Narayanan *et al.*, 1984) y una mejor tolerancia digestiva que los alimentados con fórmulas artificiales (Haiden *et al.*, 2016). A largo plazo, presentan menor riesgo cardiovascular (Lewandowski *et al.*, 2016; Singhal *et al.*, 2001). Hasta el momento, en los ensayos clínicos aleatorizados que se han realizado no se han encontrado diferencias en la tolerancia digestiva, la ganancia de peso o la prevalencia de NEC y sepsis tardía entre RNs prematuros alimentados con leche de su propia madre y los alimentados con leche donada pasteurizada (Cossey *et al.*, 2013; Giuliani *et al.*, 2012; Stock *et al.*, 2015).

Desde un punto de vista económico, el uso de leche donada supone un importante ahorro del gasto sanitario (Arnold, 2002; Ganapathy *et al.*, 2012). Así, por ejemplo, por cada euro invertido en leche donada la unidad neonatal ahorra entre 6 y 19 euros sólo en costes directos. Se ha observado que la apertura de un banco de leche no disminuye la tasa de lactancia materna y sí disminuye significativamente la exposición a fórmulas artificiales en las primeras 4 semanas de vida (Arslanoglu *et al.*, 2013; Utrera Torres *et al.*, 2010; Vázquez-Román *et al.*, 2014).



**Figura 2.** Diagrama de flujo de la vía clínica para la extracción, conservación y administración de leche materna a los RNs hospitalizados en el Servicio de Neonatología del Hospital 12 de Octubre. Fuente: Bustos (2009).

Dados los problemas asociados al uso de fórmulas artificiales en RNs de riesgo alto, no sería éticamente razonable su empleo en aquellas unidades neonatales que dispongan de leche donada (Arnold, 2006). Por ello, actualmente se fomenta el uso de la leche donada con el fin de que se convierta en el estándar de alimentación de aquellos neonatos de riesgo alto que no disponen de la leche de su propia madre.

Dado que todas las muestras de leche analizadas en esta Tesis Doctoral se obtuvieron del Banco de Leche Regional de la Comunidad de Madrid, se incluye más adelante un capítulo sobre los procedimientos que caracterizan este banco de leche y el efecto que tiene el tratamiento de pasteurización sobre los componentes de la leche donada.

#### **III.1.4. Fórmulas adaptadas**

Las fórmulas infantiles representan la tercera opción, en orden de prioridad, para la alimentación de los prematuros y, únicamente, se deberían emplear cuando no sean posibles ninguna de las dos opciones anteriores (leche de la propia madre y leche donada pasteurizada) ya que aumentan los riesgos a corto y largo plazo (Brahm y Valdés, 2017). En caso de utilizarse, hay evidencias de que las fórmulas específicas para neonatos prematuros tienen beneficios sobre las fórmulas de inicio convencionales en los nacidos con menos de 32 semanas de gestación (Hay *et al.*, 2017)

La composición adecuada de estas fórmulas es aún objeto de controversia, difiriendo ligeramente de una marca comercial a otra (Tabla 1). Esto es un reflejo de que los requerimientos nutricionales de los nacidos pretérmino no están claramente establecidos, especialmente en los más inmaduros y en los que tuvieron crecimiento intrauterino retardado y, particularmente, en lo concerniente a la relación energía/proteína, la composición de la grasa y el contenido en calcio, fósforo, sodio, cloro, yodo y vitaminas A y D (Corvaglia, 2015).

En su formulación se emplea la lactosa como principal fuente de hidratos de carbono aunque, en ocasiones, se combina con otras fuentes, como las maltodextrinas, por su bajo coste y fácil digestión. La principal función de las proteínas en el prematuro es trófica, es decir, la formación de tejidos, por lo que deben predominar las proteínas del suero (2,25-3,10 g/100 kcal). La síntesis de L-carnitina en el hígado, riñones y cerebro del prematuro es escasa, por lo que se suele añadir en estos preparados. Las grasas deben aportar entre el 40 y 50% de la energía. El contenido en ácidos grasos (AG) esenciales (AGE) linoleico y linolénico es importante; considerándose adecuado el aporte de 0,5-0,7 g/100 kcal y 70-150 g/100 kcal, respectivamente. La escasa capacidad para elongar estos AGs hace que los ácidos araquidónico (ARA) y docosahexanoico (DHA) sean esenciales en el prematuro. El enriquecimiento en estos AG poliinsaturados (PUFAs, por sus siglas en inglés) puede realizarse por su adición en



forma pura o mediante el uso de huevo o pescado como fuentes lipídicas. Aunque aún no están claros los beneficios a largo plazo de la suplementación de las fórmulas con PUFA's (Moon *et al.*, 2016), algunos ensayos clínicos han demostrado mejoras en algunos marcadores inmunológicos en niños alimentados con fórmulas suplementadas con ARA y DHA en comparación con las fórmulas no suplementadas. Eso parece indicar que dichos PUFA's reducen el riesgo de padecer determinadas enfermedades, incluyendo el desarrollo de alergias y atopía en los primeros años de vida (Richard *et al.*, 2016).

**Tabla 1.** Composición (%) y características de las fórmulas de prematuros disponibles en el mercado (por 100 g de producto).

	HC (fuente)	Proteínas (Ca/ Se)	Grasa	kcal	PUFA's	Otros
<b>PreAdapta</b>	56,4 (L/M)	14,9 <sup>a</sup> (40/60)	25,9	519	SI	T, C, S
<b>Adapta PEG</b>	52,7 (L)	12,4 (40/60)	29,6	527	SI	C, S
<b>Almirón Neonatal</b>	50,6 (L/M)	15,6 (40/60)	28,5 <sup>b,c</sup>	521	SI	T, C, S
<b>Pre-Aptamil H.A</b>	48,8 (L/M)	15,2 <sup>a</sup> (0/100)	27,8 <sup>c</sup>	506	SI	T, C, S
<b>Blemil plus prematuro</b>	54,7 (L/M)	14,5 (35/65)	25,8 <sup>d</sup>	509	SI	T, C, S
<b>Enfalac prematuro</b>	55,0 (L/PG)	14,5 (40/60)	25,0 <sup>e</sup>	490	SI	T, C
<b>Alprem</b>	53,6 (L/M)	13,6 <sup>a</sup> (22/78)	26,0 <sup>f</sup>	506	SI	T, C
<b>Nutribén R.N bajo peso</b>	53,9 (L/M)	12,9 (45/55)	27,3	510	SI	T, A
<b>Similac special Neo</b>	52,8 (L/M)	13,3 (47/53)	28,2 <sup>g</sup>	513	NO	T, C, S, N

A: L-arginina; C: L-carnitina; Ca: caseínas; HC: hidratos de carbono; L: lactosa; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga; M: maltodextrina; N: nucleótidos; PG: polímeros de glucosa; S: selenio; Se: seroproteínas; T: taurina.

a: proteína hidrolizada; b:  $\beta$ -palmitato (45%); c: sin triglicéridos de cadena media (TCM); d: 10% de TCM; e: 40% de TCM; f: 30% de TCM; h: 25% de TCM.

Fuente: Adaptado de Cilleruelo y Calvo (2004).

### III.1.5. Fortificación de la leche humana

En el prematuro de muy bajo peso (<1.500 g) la leche humana suele ser insuficiente para cubrir sus requerimientos nutricionales, especialmente de proteínas, calcio, fósforo y sodio, por lo que debe ser complementada (Brown *et al.*, 2016; Radmacher y Adamkin, 2017). Las recomendaciones de aporte proteico más comúnmente aceptadas en estos RNs se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Recomendaciones proteicas en RNs con <1.200 g y >1.200 g de peso

	Peso < 1.200 g		Peso > 1.200 g	
	g/kg/día	g/100 kcal	g/kg/día	g/100 kcal
<b>Ziegler</b>	4,0	3,7	3,6	2,8
<b>Kashyap</b>	—	—	3,0	2,5
<b>Rigo</b>	3,8 – 4,2	3,3	3,4 – 3,6	2,8
<b>LSRO</b>	3,4 – 4,3	2,5 – 3,6	3,4 – 4,3	2,5 – 3,6
<b>ESPGHAN 2010</b>	4,0 – 4,5	3,6 – 4,1	3,5 – 4,0	3,2 – 3,6

LSRO: Life Sciences Research Organization; ESPGHAN: European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition. Fuente: Corvaglia (2015).

Los fortificantes son productos, en polvo o líquidos, que contienen proteínas o aminoácidos, carbohidratos, grasas, minerales y vitaminas en diferentes cantidades, con el objetivo de que la leche humana complementada aporte entre 80 y 85 kcal/100 mL. Habitualmente se elaboran a partir de proteínas hidrolizadas de leche de vaca para reducir las intolerancias y el riesgo de que algún niño padezca alergia a algunas de las proteínas de partida (Maggio *et al.*, 2009; Reali *et al.*, 2010). Los fortificantes más empleados en España son FM85® (Nestlé), Eoprotin® (Milupa) y Efamil® (Mead-Johnson). Así mismo, también existen fortificantes elaborados a partir de leche humana (Prolacta Bioescience Inc.) aunque en España no están disponibles y su uso resultaría controvertido desde el punto de vista ético ante la falta de disponibilidad de leche donada para abastecer a todos los niños prematuros que la requieren.

Los fortificantes habitualmente se emplean una vez que se ha alcanzado la alimentación enteral exclusiva con buena tolerancia (>80-100 mL/kg/día). Se empieza con una concentración baja (1-2 gramos por 50 mL de leche) y se aumenta diariamente hasta alcanzar la cantidad deseada o la cantidad máxima recomendada por el fabricante.

Las evidencias disponibles recomiendan individualizar la fortificación en cada RN para conseguir el aporte de energía y el crecimiento recomendado en cada

momento. En relación a la cantidad de proteínas administradas, existen tres procedimientos distintos. El primero consiste en administrar las dosis de fortificante en la leche siguiendo las recomendaciones del fabricante, lo que se conoce como fortificación a ciegas (en inglés, *blind fortification*). El segundo es el conocido como fortificación individualizada (en inglés, *targeted fortification*) (Polberger, 2015) y se basa en analizar la cantidad de proteína de la leche materna y añadir el fortificante en función de los resultados arrojados por dicho análisis. En este caso, es necesario contar con dispositivos calibrados para el análisis rápido de macronutrientes de la leche (Arnold *et al.*, 2017). Finalmente, el método denominado fortificación adaptada (en inglés, *adjustable fortification*) consiste en la adición del fortificante en base al estudio del nitrógeno ureico en sangre del RN (Arslanoglu, 2015).

Deben extremarse las condiciones higiénicas durante la manipulación de los fortificantes para evitar la contaminación microbiológica de la leche, especialmente de la donada donde la actividad bactericida está reducida como consecuencia de la pasteurización (Silvestre *et al.*, 2008). Así mismo, una vez añadido el fortificante a la leche, la dextrinomaltosa empieza a hidrolizarse, aumentando en unas horas la osmolaridad. Por este motivo, la leche fortificada no debe almacenarse más de unas pocas horas para evitar problemas gastrointestinales (Rosas *et al.*, 2016).

## III.2. LECHE HUMANA

### III.2.1. Definiciones

El primer fluido producido por las madres después del parto es el calostro, que es distinto en volumen, aspecto y composición a la leche que se produce en días posteriores. El calostro, producido en cantidades bajas en los primeros días, es rico en componentes inmunológicos tales como IgA secretora (SIgA), lactoferrina, leucocitos y factores de desarrollo tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Castellote *et al.*, 2011). El calostro también contiene concentraciones relativamente bajas de lactosa, lo que indica que sus funciones primarias son inmunológicas y tróficas más que nutricionales. Los niveles de sodio, cloruro y magnesio son más altos, y los de potasio y calcio más bajos, en el calostro que en la leche posterior (Boyce *et al.*, 2016). En consecuencia, sería muy conveniente iniciar la alimentación enteral de los RNs prematuros utilizando el calostro de la propia madre o, en su defecto, de un banco de leche, ya que es un procedimiento sencillo, barato y bien tolerado (Rodríguez *et al.*, 2010).

Cuando se produce el cierre de las zonas de oclusión del epitelio mamario, disminuye la relación sodio/potasio y aumenta la concentración de lactosa. Esto indica el comienzo de la activación secretora y la producción de la leche de transición. El momento de la activación secretora (etapa II de la lactogénesis) varía entre las mujeres, pero suele ocurrir durante los primeros días posparto. El inicio tardío de la lactogénesis, definido como aquel que tiene lugar después de 72 h tras del parto, parece ocurrir más frecuentemente con parto prematuro y obesidad materna y se puede predecir por marcadores de salud metabólica (Nommsen-Rivers *et al.*, 2012). La leche de transición comparte algunas de las características del calostro, pero se produce en mayor cantidad para hacer frente a las necesidades nutricionales y de desarrollo del lactante en crecimiento. Suele considerarse leche de transición entre los días 5 y 14 después del parto. Después de este periodo, se considera que la leche es madura. En contraste con el cambio en la composición observado en el primer mes de vida, la leche madura mantiene una composición constante, observándose tan solo pequeños cambios durante el curso de la lactancia (Lønnerdal *et al.*, 2017; Shehadeh *et al.*, 2006).

### III.2.2. Leche de madres con RN prematuros

En 1978 se describió por primera vez que la edad gestacional (EG) en el momento del parto afectaba a la composición de la leche materna (Atkinson *et al.*, 1978). Trabajos posteriores han comprobado que la leche de las madres que han tenido un hijo prematuro está particularmente adaptada para satisfacer las necesidades específicas de esa población (Boyce *et al.*, 2016; Mimouni *et al.*, 2017).

En este sentido, la estimación de las proteínas, basada en la medida del nitrógeno total, sugiere que la leche de madres de prematuros suele tener una mayor cantidad de este macronutriente (alrededor de un 35-40%, lo que equivale a 0,8 g/dL) en los primeros días, aunque a partir del día 3, esta diferencia comienza a disminuir (Tabla 3). El contenido de grasa de la leche de madres con niños prematuros muestra diferencias estadísticamente significativas con la leche de madres de niños nacidos a término; durante los primeros días de vida, la leche de prematuro tiene alrededor de un 20% más de grasa que la leche a término (Tabla 4). Por el contrario, no parece haber cambios en la concentración de lactosa (Tabla 5).

**Tabla 3.** Comparación entre la concentración de proteína total (g/dL) en la leche de madres con niños pretérmino y en la leche de madres con niños a término.

	Petérmino			Término			<i>P</i> *
	Media	DE		Media	DE		
Franja de tiempo:	(g/dL)		n	(g/dL)		n	
<b>1-3 días</b>	2,8	1,1	94	2,0	0,6	168	<0,00001
<b>4-7 días</b>	2,1	0,5	244	2,0	0,5	229	0,04
<b>Semana 2</b>	1,9	0,4	253	1,8	0,4	192	<0,00001
<b>Semana 3-4</b>	1,6	0,4	439	1,5	0,3	210	0,01
<b>Semana 5-6</b>	1,4	0,3	268	1,1	0,2	357	<0,00001
<b>Semana 7-9</b>	1,1	0,2	183	1,3	0,2	453	<0,00001
<b>Semana 10-12</b>	1,3	0,3	18	1,2	0,2	109	0,07

DE: desviación estándar; n: número de muestras analizadas. \*Para las comparaciones múltiples se empleó el test de Bonferroni y la significancia estadística se estableció en  $p < 0,001$ . Fuente: Adaptado de Gidrewicz y Fenton (2014).

**Tabla 4.** Comparación entre la concentración de grasa (g/dL) en la leche de madres con niños pretérmino y en la leche de madres con niños a término.

Franja de tiempo:	Petérmino			Término			<i>p</i> *
	Media	DE	n	Media	DE	n	
	(g/dL)			(g/dL)			
1-3 días	2,2	0,9	76	1,8	0,7	74	0,002
4-7 días	3,0	1,2	111	2,6	0,8	136	0,002
Semana 2	3,5	1,1	158	3,0	0,9	48	0,010
Semana 3-4	3,5	1,0	180	3,4	0,8	127	0,120
Semana 5-6	3,2	0,8	95	3,6	1,1	20	0,070
Semana 7-9	3,3	0,9	120	3,4	0,8	83	0,380
Semana 10-12	3,7	1,5	22	3,4	0,9	95	0,310

DE: desviación estándar; n: número de muestras analizadas. \*Para las comparaciones múltiples se empleó el test de Bonferroni y la significancia estadística se estableció en  $p < 0,001$ . Fuente: Adaptado de Gidrewicz y Fenton (2014).

**Tabla 5.** Comparación entre la concentración de lactosa (g/dL) en la leche de madres con niños pretérmino y en la leche de madres con niños a término.

Franja de tiempo:	Petérmino			Término			<i>p</i> *
	Media	DE	n	Media	DE	n	
	(g/dL)			(g/dL)			
1-3 días	5,1	0,7	95	5,6	0,6	59	<0,00001
4-7 días	6,3	1,1	114	6,0	1,0	281	0,009
Semana 2	5,7	0,8	231	6,2	0,6	100	<0,00001
Semana 3-4	6,0	0,5	225	6,7	0,7	193	<0,00001
Semana 5-6	5,8	0,6	104	6,1	1,0	22	0,060
Semana 7-9	6,3	0,4	123	6,5	0,5	646	<0,00001
Semana 10-12	6,8	0,3	28	6,7	0,7	58	0,470

DE: desviación estándar; n: número de muestras analizadas. \*Para las comparaciones múltiples se empleó el test de Bonferroni y la significancia estadística se estableció en  $p < 0,001$ . Fuente: Adaptado de Gidrewicz y Fenton (2014).

En relación con la concentración de oligosacáridos y los niveles de calcio y fósforo, no se han encontrado diferencias entre la leche de prematuro y término (Gidrewicz and Fenton, 2014; Kunz *et al.*, 2016).

Hasta el momento, son escasos los ensayos clínicos aleatorizados en los que se compara el efecto de la leche donada de prematuro y a término en el crecimiento y desarrollo de RN de muy bajo peso (Dempsey y Miletin, 2010).

La lactoferrina y la lactoalbúmina son las proteínas cuya concentración es muy superior en la leche de madres de RNs prematuros, al igual que diversos péptidos libres relacionados con la mejora digestiva y la inmunidad innata, en comparación con la leche de madres de niños a término (Albenzio *et al.*, 2016). La composición lipídica también varía, observándose mayor cantidad de AG de cadena media y de ciertos PUFAs, como el DHA y el ARA, ambos de gran importancia en el desarrollo visual y cerebral de estos niños (De Rooy *et al.*, 2016). Recientemente se ha observado que el calostro de madres de RN muy prematuros poseía una concentración más elevada de diversos compuestos inmunológicos, incluyendo IgA, IgG, interleuquina (IL)-6, el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , del inglés *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* ), IL-4, IL-13, IL-17, la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1, del inglés *Monocyte Chemoattractant Protein-1*), la proteína inflamatoria de macrófagos 1 $\beta$  (MIP-1 $\beta$ , del inglés *Macrophage Inflammatory Protein 1 $\beta$* ), IL-5, IL-7 o el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF, del inglés *Granulocyte Colony Stimulating Factor*), que la observada en muestras de calostro de mujeres con embarazos a término (Espinosa-Martos *et al.*, 2013; Moles *et al.*, 2015).

El caso del *mio*-inositol es otro buen ejemplo de la adaptación de la leche materna a la EG del neonato. En contraste con la lactosa o la glucosa, la concentración de este carbohidrato disminuye significativamente a medida que transcurre la lactancia (Moles *et al.*, 2015). El inositol promueve la maduración de varios componentes del surfactante y puede desempeñar un papel crítico en la vida fetal y neonatal. En una revisión Cochrane relativamente reciente se llegó a la conclusión de que la complementación de la dieta de prematuros con *mio*-inositol conduce una reducción estadísticamente significativa y clínicamente relevante en la tasa de diversas complicaciones habituales en los niños prematuros (Howlett *et al.*, 2012).

### III.2.3. Composición microbiológica

#### III.2.3.1. Bacteriología de la leche humana

Las primeras descripciones de la diversidad bacteriana en muestras de leche procedentes de mujeres sanas se basaron en el empleo de medios de cultivo y pusieron de manifiesto la presencia de diversas especies de los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Weissella*, *Leuconostoc* y *Bifidobacterium* incluyendo nuevas especies

como *Streptococcus lactarius* (Gavin y Ostovar, 1977; Martín *et al.*, 2003; Heikkilä y Saris, 2003; Marín *et al.*, 2009) El hecho de que bacterias pertenecientes a los citados géneros se puedan aislar de leche obtenida higiénicamente en países muy diferentes (en términos geofísicos, socio-económicos y/o culturales) sugiere que su presencia no es un fenómeno aislado sino que, al contrario, se trata de un evento común. No parecen ser, por tanto, resultado de una mera contaminación sino que constituyen la microbiota natural específica de la glándula mamaria y, por ende, de la leche humana.

La microbiota mamaria es ciertamente peculiar, porque el epitelio mamario únicamente secreta un fluido biológico en un periodo de tiempo muy concreto y relativamente breve. Este hecho determina que la microbiota mamaria, a diferencia de la existente en otras localizaciones, tenga una naturaleza transitoria. Así, su formación se inicia coincidiendo con la síntesis de precalostro, alcanza su máxima complejidad hacia el parto, se mantiene más o menos estable mientras dura la lactancia, sufre un declive rápido cuando empieza el destete al iniciarse los procesos de apoptosis responsables de la involución del tejido mamario y desaparece totalmente cuando no queda leche en la glándula mamaria (Fernández *et al.*, 2012). Y únicamente se volverá a formar una comunidad bacteriana en la glándula mamaria en el último tercio del siguiente embarazo.

El número de especies bacterianas cultivables existentes en la leche de mujeres sanas parece ser bajo, oscilando entre 2 y 12 (Martín *et al.*, 2011). A pesar de ello, existe una gran variabilidad interindividual, de tal manera que la leche de cada mujer tiene una composición bacteriana única, a modo de huella dactilar, de forma análoga a lo que sucede con la microbiota intestinal de niños y adultos.

Los estafilococos coagulasa-negativos, especialmente *Staphylococcus epidermidis*, los estreptococos del grupo *viridans* y las corinebacterias son las bacterias dominantes en leche materna. La presencia de especies de otros géneros es más variable (Tabla 6). De hecho, *S. epidermidis* es una característica diferencial de las heces de los niños amamantados (Adlerberth *et al.*, 2006; Jiménez *et al.*, 2008a), en las que también abundan lactobacilos, enterococos y bifidobacterias (Ahrné *et al.*, 2005; Rinne *et al.*, 2005). Sin embargo, la composición de esta microbiota depende de numerosos factores, como por ejemplo el estado de salud de la madre (Cabrera-Rubio *et al.*, 2012; Jiménez *et al.*, 2012a).



**Tabla 6.** Especies bacterianas aisladas o detectadas mediante técnicas moleculares en leche de mujeres sanas

<i>Staphylococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Otras bacterias lácticas	Otras bacterias Gram-positivas	Bacterias Gram-negativas
<i>S. aureus</i>	<i>S. bovis</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Actinomyces odontolyticus</i>	<i>Acinetobacter johnsonii</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>S. mitis</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Arthrobacter cummingsii</i>	<i>Bacteroides</i> sp.
<i>S. hominis</i>	<i>S. oralis</i>	<i>L. gastricus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Bacillus vietnamiensis</i>	<i>Burkholderia multivorans</i>
<i>S. xyloso</i>	<i>S. parasanguis</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>B. catenolatum</i>	<i>Leuconostoc citreum</i>	<i>B. pumilus</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. salivarius</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Leuconostoc fallax</i>	<i>Corynebacterium aurimucosum</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. infantis</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. longum</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>C. coyleae</i>	<i>Klebsiella milletis</i>
	<i>S. peroris</i>	<i>L. salivarius</i>		<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>C. pseudogenitalium</i>	<i>K. oxytoca</i>
		<i>L. vaginalis</i>		<i>Weissella cibaria</i>	<i>Gemella haemolysans</i>	<i>K. pneumoniae</i>
		<i>L. lactarius</i>		<i>Weissella confusa</i>	<i>Kocuria kristinae</i>	<i>Kluyvera cryocrescens</i>
					<i>K. rhizophila</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
					<i>Micrococcus luteus</i>	<i>P. pseudoalcaligenes</i>
					<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	<i>P. synxanthia</i>
					<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Serratia proteamaculans</i>
					<i>P. granulorum</i>	
					<i>Rothia mucilaginosa</i>	

Fuente: Fernández *et al.* (2013).

### III.2.3.2. Origen de las bacterias aisladas en leche humana

Tradicionalmente se ha considerado que durante el parto la cavidad oral del niño se contaminaba con bacterias procedentes de las microbiotas vaginal y/o intestinal de la madre; posteriormente, las bacterias pasarían de la boca del niño al pecho de la madre y, en consecuencia, contaminarían la leche al ser eyectada (Tannock, 1995). Sin embargo, una parte sustancial de dichas bacterias parecen proceder de la microbiota intestinal de la madre y accederían al epitelio de la glándula mamaria a través de una ruta interna, denominada entero-mamaria. Esta ruta se establece específicamente durante los últimos meses de gestación y la lactancia (Bertotto *et al.*, 1991) y es la que permite la circulación de células del sistema inmunitario entre los distintos compartimentos del tejido linfoide asociado a mucosas (Roitt, 2006). De hecho, las bacterias intestinales comensales tras unirse a las células dendríticas u otras poblaciones de células CD18+, pueden propagarse a mucosas distantes de la del aparato digestivo (Pérez *et al.*, 2007; Rescigno *et al.*, 2001). Esta ruta explicaría la presencia en la leche humana de algunas bacterias pertenecientes a géneros de carácter anaerobio estricto como *Bifidobacterium* o *Veillonella*.

Obviamente, son necesarios más estudios para dilucidar los mecanismos por los que ciertas bacterias de la microbiota intestinal materna pueden colonizar el epitelio de la glándula mamaria. Pero los resultados de los estudios realizados hasta la fecha sugieren que la modulación de la microbiota intestinal de la madre durante el embarazo y la lactancia puede tener un efecto directo en la salud de los lactantes. Por otra parte, en la leche de madres de niños prematuros es más difícil detectar la presencia de microorganismos que en la de madres de nacidos a término (Moles *et al.*, 2015). Este hecho puede relacionarse con la antibioterapia recibida durante el embarazo o la lactancia (Soto *et al.*, 2014) o con que no se haya formado aún una ruta entero-mamaria funcional (Jost *et al.*, 2014). Este déficit de microorganismos viables en la leche de madres de niños prematuros se podría compensar mediante la administración de probióticos al niño (Dermyshe *et al.*, 2017).

### III.2.3.3. Funciones de las bacterias de la leche humana

Las primeras semanas de vida constituyen el periodo más dinámico en el ecosistema gastrointestinal desde un punto de vista bacteriológico. La presencia de una microbiota intestinal resulta crítica ya que son esenciales para la modulación inicial del sistema inmunitario, el correcto funcionamiento de importantes rutas metabólicas, la exclusión de cepas patógenas de enterobacterias, enterococos, estreptococos y estafilococos (los principales agentes causales de sepsis infantiles) y la creación de un ambiente reductor que permita el desarrollo posterior de bacterias anaerobias estrictas.

Indiscutiblemente, la leche materna es una fuente de cientos de filotipos bacterianos para el tracto gastrointestinal del lactante, los cuales puede ejercer efectos beneficiosos frente a enfermedades gastrointestinales y respiratorias, y reducir el

riesgo de desarrollar otras enfermedades cada vez más preocupantes, como la diabetes o la obesidad (Hunt *et al.*, 2011; Sanz, 2011).

Por último, conviene destacar que entre las bacterias aisladas normalmente de la leche materna existen algunas especies, como *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* o *Bifidobacterium bifidum*, que se incluyen habitualmente entre las potencialmente probióticas y que disfrutan del estatus de Presunción Cualificada de Seguridad (QPS; del inglés, *Qualified Presumption of Safety*) concedido por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA; del inglés, *European Food Safety Authority*).

#### III.2.4. Composición bioquímica e inmunológica

Los componentes nutritivos e inmunológicos presentes en la leche humana pueden tener diversos orígenes. Unos derivan de la síntesis en el lactocito, otros son de origen dietético y, algunos otros, proceden de las reservas maternas. Cabe destacar el impacto que ha demostrado tener la dieta materna en relación con el contenido de determinadas vitaminas y, específicamente, la composición de AG de la leche (Bravi *et al.*, 2016). En definitiva, se trata de un fluido con una gran complejidad composicional en el que se encuentran glúcidos, lípidos, proteínas, vitaminas, minerales, nucleótidos y diversos compuestos bioactivos (Tablas 7, 8 y 9).

La lactosa, formada por glucosa y galactosa, es el disacárido mayoritario y exclusivo de la leche (Tabla 7) (Newburg, 2013). Es el componente menos variable y regula la cantidad de leche producida. Es fácilmente hidrolizada por la  $\beta$ -galactosidasa (o lactasa) presente en el intestino del neonato y, por ello, es una importante fuente de energía para el lactante.

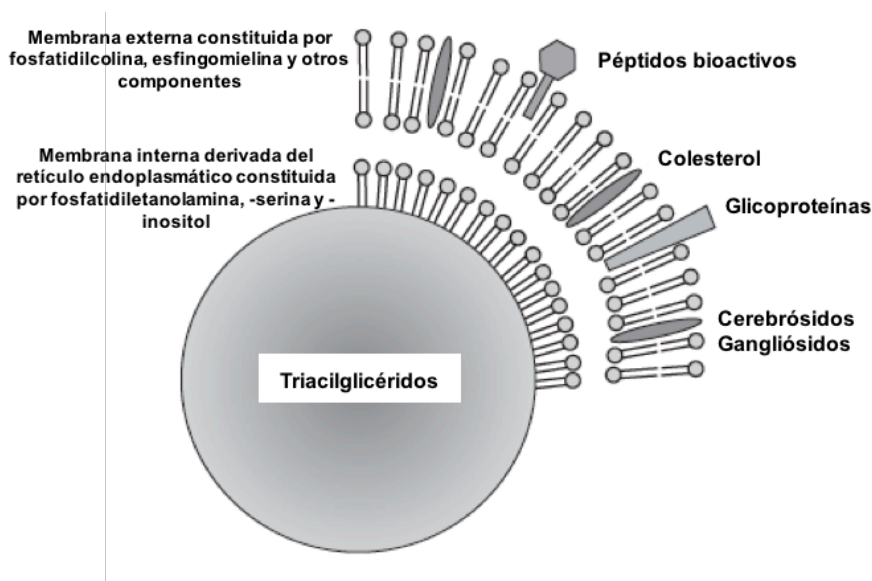
La fracción glucídica de la leche humana se compone no solo de lactosa, sino también de otros carbohidratos como los oligosacáridos (HMOs, del inglés *Human Milk Oligosaccharides*), los glicolípidos, las glicoproteínas y los azúcares asociados a los nucleótidos. Los HMOs, a diferencia de la leche de otras especies, constituyen el tercer componente mayoritario de la leche materna (Moukarzel y Bode, 2017). Dichas biomoléculas constan de un extremo reductor que se corresponde con una molécula de lactosa y otro extremo no reductor en el que ocasionalmente se puede encontrar ácido siálico y fucosa; en general, están formados por combinaciones de 5 monosacáridos diferentes: glucosa, galactosa, ácido siálico (ácido *N*-acetilneuramínico), fucosa y *N*-acetilglucosamina. Se calcula que el calostro y la leche materna madura contienen alrededor de 20-23 g/L y 12-14 g/L de oligosacáridos, respectivamente (Coppa *et al.*, 1999). Gracias a las modernas técnicas analíticas, recientemente se han identificado más de 200 especies moleculares distintas (Ninonuevo *et al.*, 2006). También hay que señalar que la capacidad para producir HMOs tiene una importante base genética. En consecuencia, el perfil de estos compuestos varía, tanto cualitativa como

cuantitativamente, cuando se comparan muestras de leche de distintas mujeres (Stahl *et al.*, 2001).

Estos HMOs no son metabolizados por las enzimas del tracto digestivo del lactante, pero promueven una correcta colonización intestinal porque son utilizados por ciertas bacterias, como las pertenecientes a los géneros *Bifidobacterium* y *Staphylococcus*; es decir, tienen acción prebiótica (Underwood *et al.*, 2015). Además, el hecho de que existan similitudes entre los carbohidratos de la superficie de las células epiteliales del intestino y los HMOs de la leche sugiere que estos últimos podrían actuar como homólogos o análogos de los receptores celulares con los que interaccionan los microorganismos patógenos. Por ello, impedirían el acceso de los patógenos a las células de la mucosa intestinal y, de esta forma, constituirían un mecanismo de defensa adicional para los neonatos. Los HMOs de la leche humana tienen epítomos de unión para las selectinas, unos receptores implicados en la adhesión celular, por lo que podrían ejercer funciones inmunomoduladoras en el intestino infantil (Bode, 2012). Finalmente, también podrían desempeñar un importante papel como suministradores de ácido siálico, esencial para el desarrollo cerebral y cognitivo del lactante (Wang, 2012)

Los lípidos de la leche humana están compuestos por una compleja mezcla de triacilglicéridos (TAG) (98%), fosfolípidos (0,8%) y colesterol (0,5%), entre otros, que constituyen el 50-60% de las calorías que ingiere el lactante. Además, proporcionan nutrientes esenciales como vitaminas liposolubles y AGs poliinsaturados esenciales (ácidos linoleico y  $\alpha$ -linolénico), necesarios para la síntesis de membranas, eicosanoides y otros compuestos bioactivos (Kolezko, 2016). En mujeres europeas, la leche contiene alrededor de 35-40% de AG saturados, 45-50% de AG monoinsaturados y aproximadamente 15% de PUFA. Estos últimos, en particularARA y DHA, han recibido una atención considerable por su papel en el desarrollo neurológico, la función inmunitaria y en el sistema cardiovascular del RN (Forsyth *et al.*, 2017).

Estos lípidos se secretan emulsionados en forma de glóbulos grasos que tienen entre 3 y 5  $\mu\text{m}$  de diámetro. En estos glóbulos grasos, los TAG se disponen en el interior y los fosfolípidos, colesterol, glicoproteínas y otros compuestos con actividad biológica (xantina oxidasa, adipofilina, mucinas, lactadherina, butirofilina y CD36) lo hacen en el exterior (Figura 3). La estructura del glóbulo graso es de gran importancia metabólica y facilita la digestión por parte del lactante (Bourlieu y Michalski, 2015). Por otra parte, la grasa es el componente más variable de la leche. Generalmente, el contenido en grasa es mayor en mujeres con una nutrición equilibrada, en la leche madura (en comparación con el calostro), después de la comida principal y al final de la toma.



**Figura 3.** Estructura del glóbulo de grasa de la leche materna. Fuente: Adaptado de Koletzko (2016).

Las proteínas de la leche humana tienen un perfil de aminoácidos esenciales idóneo para el desarrollo y crecimiento del RN (Haschke *et al.*, 2016). Las más abundantes son las proteínas del suero, que están disueltas en la fracción soluble y tienen muchas funciones fisiológicas e inmunológicas: participan en la proliferación celular, el metabolismo lipídico, el transporte de nutrientes y la función inmunológica (Lönnerdal *et al.*, 2017). Las caseínas se encuentran en baja proporción, lo que le da a la leche humana un aspecto menos opaco en comparación con la de otras especies. Las caseínas se encuentran interaccionando entre sí formando una dispersión coloidal de partículas esféricas denominadas micelas, que contienen grandes cantidades de calcio y fosfato.

Por otro lado, la mayoría de los minerales (calcio, zinc, cobre, hierro, etc.) y la vitamina E y el ácido fólico se encuentran en la leche materna en concentraciones suficientes para cubrir los requerimientos del RN y su correcto desarrollo durante los 6 primeros meses de vida (González y Visentin, 2016). Algunos de estos micronutrientes varían dependiendo de la dieta materna y de las reservas corporales, como son las vitaminas B<sub>1</sub> (tiamina), B<sub>2</sub> (riboflavina), B<sub>3</sub> (niacina), B<sub>6</sub> (piridoxina), B<sub>12</sub> (cobalamina), A, D y el yodo (Valentine y Wagner, 2013). En este sentido, y para paliar posibles déficits, se suele recomendar a las mujeres lactantes que tomen suplementos multivitamínicos.

No obstante, independientemente de la dieta materna, las vitaminas K y D se encuentran en concentraciones extremadamente bajas en la leche humana (Pietschnig *et al.*, 1993; Wagner y Greer, 2008). Por este motivo, la AAP recomienda un suplemento de vitamina K para evitar la enfermedad hemorrágica del RN (Greer *et al.*,

1991) y una dosis de 400 UI/día de vitamina D, para todos los lactantes, comenzando en los primeros días después del nacimiento hasta el destete.

**Tabla 7.** Composición bioquímica y energía del calostro y la leche madura.

<b>Componente (por L)</b>	<b>Calostro</b>	<b>Leche madura</b>
<b>Energía (kJ)</b>	2,431	2,835
<b>Glúcidos totales (g)</b>	50 – 70	70 – 85
Glucosa (g)	0,2 – 1,0	0,2 – 0,3
Lactosa (g)	30 – 50	67 – 70
Oligosacáridos (g)	22 – 24	5 – 15
<b>Lípidos totales (g)</b>	15 – 20	35 – 48
Triacilglicéridos (g)	14,5 – 19,5	34 – 47
Ácidos grasos (g)	13 – 17	30 – 42
Colesterol (g)	0,2 – 0,3	0,1 – 0,2
Ésteres de colesterol (g)	0,05	0,01
Fosfolípidos y esfingolípidos (g)	– <sup>a</sup>	0,25 – 0,30
<b>Nitrógeno total (g)</b>	3	1,9
Nitrógeno no proteico (g)	0,5	0,45
Nitrógeno proteico (g)	2,5	1,45
<b>Proteínas totales (g)</b>	15 – 20	8 – 11
<i>Caseína (g)</i>	3,8	3 – 5
Caseína $\beta$ (g)	2,6	3 – 4
Caseína $\alpha$ (g)	1,2	1 – 2
<i>Proteínas del suero (g)</i>	11 – 15	5 – 6
$\alpha$ -lactoalbúmina (g)	3,6	2 – 3
IgM (g)	0,02	0,01
IgG (g)	0,01	0,05
Lactoferrina (g)	3,5	1 – 3
Lisozima (g)	0,1 – 0,2	0,1
IgA secretora (g)	2	0,5 – 1,0
Seroalbúmina (g)	0,4	0,3

<sup>a</sup>No indicado

Fuente: Donovan (2008).

**Tabla 8.** Composición en vitaminas y minerales del calostro y la leche madura.

	Calostro	Leche madura
<b>Vitaminas hidrosolubles</b>		
Ácido ascórbico (mg)	80 – 100	40 – 100
Ácido pantoténico (mg)	2,5	2,0 – 2,5
Biotina (µg)	4,5	5 – 9
Folato (µg)	5 – 10	50 – 100
Niacina (mg)	0,5d	1,5 – 2
Piridoxina, B <sub>6</sub> (µg)	20 – 40	90 – 300
Riboflavina, B <sub>2</sub> (µg)	500	300 – 400
Tiamina, B <sub>1</sub> (µg)	20	160 – 210
Vitamina B <sub>12</sub> (µg)	1,2 – 1,5	0,5 – 0,8
<b>Vitaminas liposolubles</b>		
Vitamina A y carotenoides		
Ésteres de retinol (µmol)	1,45–2,00	1,22
Carotenoides totales (µmol)	5,35	1,8 – 3,0
Caroteno α (µmol)	0,17	0,02 – 0,03
Caroteno β (µmol)	0,42	0,04 – 0,07
Criptoxantina β (µmol)	0,23	0,03 – 0,06
Luteína/zeaxantina (µmol)	0,20	0,04 – 0,10
Licopeno (µmol)	0,51	0,02 – 0,06
Vitamina D <sub>3</sub> (colecalfiferol) (µg)	0,1 – 0,3	0,1 – 1,0
Vitamina E (colecalfiferol) (µg)		
Tocoferol α (mg)	15	3 – 5
Tocoferol γ (mg)	1,5	1,0
Vitamina K		
Filoquinona, K <sub>1</sub> (µg)	1,8 – 2,3	1,5 – 3,0
Menaquinona, K <sub>2</sub> (µg)	2,4 – 2,6	1,2 – 2,0
<b>Minerales</b>		
Boro (µg)	30	28
Calcio (mg)	250	200 – 250
Cloro (mg)	600 – 800	400 – 450
Cobre (mg)	0,5 – 0,8	0,1 – 0,3
Cromo (µg)	17	25 – 75
Flúor (µg)	5 – 20	4 – 15
Fósforo (mg)	120 – 160	120 – 140
Iodo (µg)	40 – 50	140 – 150
Magnesio (mg)	30 – 35	30 – 35
Manganeso (µg)	5 – 12	3 – 4
Potasio (mg)	600 – 700	400 – 550
Selenio (µg)	235 – 32	10 – 25
Sodio (mg)	300 – 400	150 – 250
Zinc (mg)	5 – 12	1 – 3

<sup>a</sup> No indicado

Fuente: Donovan (2008).

Por último, la leche materna es fuente de una gran diversidad de compuestos con actividad biológica que contribuyen al adecuado desarrollo del lactante (Tabla 9). Como compuesto bioactivo se entiende aquella sustancia extranutricional que afecta a los procesos fisiológicos y que, en consecuencia, influye positivamente y de manera cuantificable en la salud de un individuo. El rango de procesos fisiológicos que pueden verse influidos es muy amplio e incluye funciones digestivas (incluyendo la absorción de nutrientes y el desarrollo de la microbiota intestinal), neurológicas, cardiovasculares e inmunológicas.

Los factores inmunológicos fueron probablemente los primeros compuestos bioactivos identificados en la leche materna (Hanson, 1961). Sin embargo, con el desarrollo de nuevas técnicas analíticas, el número de compuestos con actividad biológica descubiertos en este complejo fluido ha aumentado notablemente.

La naturaleza química de estas sustancias es muy diversa y, en ocasiones, la actividad biológica aparece tras la modificación de un componente predecesor, por ejemplo tras una reacción de hidrólisis en el tracto gastrointestinal. Además, muchos de los efectos biológicos atribuidos a la leche materna resultan de la acción sinérgica de distintas sustancias, incluso de distinta naturaleza química. Un ejemplo ilustrativo es la excelente protección que ofrece la leche humana al RN frente a las enfermedades infecciosas, un efecto en el que parecen intervenir activamente lípidos y péptidos con actividad antimicrobiana, enzimas, anticuerpos, macrófagos, linfocitos y las bacterias mutualistas que componen la microbiota de la leche. Por si fuera poco, muchos de estos compuestos pueden intervenir en diversos procesos fisiológicos. En cualquier caso, y aunque algunos compuestos bioactivos se encuentran en concentraciones pequeñas, sus actividades suelen ser relevantes para el crecimiento y maduración de numerosos órganos y tejidos del RN y/o para su protección frente a agentes patógenos. En este sentido, es de especial relevancia preservar, en la medida de lo posible, la actividad de estos compuestos durante la manipulación, conservación o pasteurización que se realiza en los bancos de leche humana (BLH) y en las UCIN.



**Tabla 9.** Actividad biológica de los principales componentes de la leche humana

<b>PROTEÍNAS y PÉPTIDOS</b>	Caseínas	Transporte de minerales (Ca, Fe, Zn, Cu) Precursoras de péptidos bioactivos
	Glicomacropéptido	Actividad antiviral Factor bifidogénico Precursor de péptidos bioactivos
	Lactoferrina	Absorción de hierro Actividad antimicrobiana Actividad antioxidante Inmunomodulación
	Lisozima	Actividad antimicrobiana
	Inmunoglobulinas	Protección inmunológica
	$\alpha$ -Lactalbúmina	Síntesis de lactosa en glándula mamaria Transporte de calcio Actividad anticarcinogénica (HAMLET)*
	Glutation peroxidasa Catalasa Superóxido dismutasa	Actividad antioxidante
<b>LÍPIDOS</b>	PUFAs (ARA, DHA)	Desarrollo neurológico Desarrollo cognitivo Función visual
	Ácidos grasos de cadena corta	Actividad antimicrobiana Actividad anticarcinogénica Protección del epitelio intestinal
	Ácido linoleico conjugado	Actividad anticarcinogénica Factor de crecimiento
<b>GLÚCIDOS</b>	Oligosacáridos (HMOs)	Prebióticos Actividad antimicrobiana y antivírica
	Mucinas	Ligandos para proteínas
<b>OTROS</b>	Poliaminas	Maduración, desarrollo del epitelio intestinal Inmunomodulación
	Nucleótidos y nucleósidos	Inmunomodulación Desarrollo, funcionamiento del epitelio intestinal Metabolismo lipídico
	Hormonas y factores de crecimiento	Regulación de distintas funciones
	Microbiota comensal	Colonización del intestino Protección frente a infecciones Desarrollo del sistema inmunológico Desarrollo cognitivo
	Células del sistema inmunitario	Protección inmunológica
	Membrana del glóbulo graso	Protección frente a infecciones

\*En asociación con el ácido oleico induce apoptosis de tumores y sensibiliza a los patógenos frente a los antibióticos (HAMLET, del inglés *Human Alpha-lactoalbumina Made LEthal to Tumor cells*). DHA: ácido docosahexaenoico; HMOs: oligosacáridos; PUFAs: Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. Fuente: adaptado de Donovan (2008) y Hamosh (2001).

### III.3. LECHE DONADA

#### III.3.1. Historia y situación actual de los bancos de leche

Desde el principio de los tiempos, las mujeres que estaban amamantando a sus hijos establecieron de forma espontánea una red solidaria de “donación de leche” que contribuyó a disminuir la mortalidad infantil. Cuando una mujer fallecía en el postparto, tenía que desplazarse o no tenía suficiente leche, las mujeres de su misma comunidad que estaban lactando amamantaban a su hijo tanto tiempo como fuera necesario. Más tarde, las amas de cría fueron durante siglos la única alternativa para los niños que no recibían leche de su madre. Los atributos necesarios para ser una buena ama de cría ya se describían en el Código de Hammurabi (2250 a.C.). En ese momento de la historia se pensaba que los niños recibían la inteligencia y los valores a través de la leche del ama de cría, por lo que era muy importante el proceso de selección de las mismas. En la Europa del siglo XIII, el trabajo femenino remunerado más frecuente y mejor pagado era el de ama de cría (Emily *et al.*, 2009).

Con los cambios sociales que ocurrieron a lo largo del siglo XIX cada vez resultaba más difícil encontrar amas de cría para lactar a los niños abandonados u hospitalizados. De este modo, a principios del siglo XX, se crearon los primeros bancos de leche, siendo el de Viena (Austria) el primero en abrir sus puertas en el año 1909 (Arnold y Erickson, 1988). En 1919 se pusieron en marcha dos nuevos bancos en Alemania (Springer, 1997). El primer banco en EE.UU. surgió en Boston en 1911 con el nombre *Boston Wet Nurses Directory*. En sus comienzos contaba con 8 nodrizas que residían en las instalaciones del banco de leche y que amamantaban a los niños directamente o se extraían leche para proporcionarla a aquellos que estaban en sus casas. El *Boston Wet Nurses Directory* se reconoció oficialmente como banco de leche en 1919 (Arnold, 1997). A partir de este momento, se comenzó a distribuir entre las donantes instrucciones sobre higiene, dieta y forma de extraerse la leche; sus honorarios ascendían a 28 dólares mensuales (Hoobler, 1917).

Dada la ausencia de frigoríficos en los primeros años de los bancos, la conservación de la leche era un reto importante. En 1909 dos médicos alemanes consiguieron preservar la leche de madre durante 32 días añadiendo peróxido de hidrógeno (Arnold, 1992). En 1930 el mismo banco de leche de Boston pone en marcha un sistema de refrigeración rápida de la leche de madre (Asquith, 1988), lo que le permitió en 1931 proporcionar leche de madre a 22 hospitales (Talbot, 1928). En 1936 se desarrolla un método de procesar la leche que la mantiene estéril durante 2 años (Asquith, 1988). En 1939 ya existían doce bancos de leche en EE.UU. (Jones, 2003)

Paralelamente a este movimiento de creación de bancos de leche, el Dr. León Dufour organizó la "Gota de Leche" en Elbeuf (Francia), cuyo objetivo era ofrecer alimentación artificial a lactantes cuyas madres carecían de leche para poder

alimentarlos y de medios económicos para pagar a una nodriza. Esta institución, fundada en 1898, poseía instalaciones en las que se realizaba el control de calidad en un laboratorio a la leche de vaca. Esta leche se esterilizaba en autoclave durante un cuarto de hora a una temperatura entre 105 y 115°C. Sin embargo, no se prestaba atención ni a la recogida ni al procesamiento de leche de madre, aunque circunstancialmente podían distribuirla. Por tanto, este movimiento se alejaba de los objetivos de los verdaderos bancos de leche de madre que surgían en Europa.

El Dr. Francisco Vidal Soares fue, en realidad, un predecesor del movimiento de la “Gota de Leche” porque, ya desde 1890, atendía en Barcelona un consultorio de carácter gratuito para niños lactantes, en donde también se les dispensaba leche de vaca esterilizada y harina. Rafael Ulecia y Cardona fundó en Madrid el Primer Consultorio de Niños de Pecho y Gota de Leche en 1904. Antes de poner en marcha el proyecto, Ulecia había visitado en Francia el Consultorio de Budin (París) y el Dispensario de Variot (Belleville), copiando para su institución las técnicas de “maternización” de la leche de vaca mediante el desnatado, centrifugación y esterilización. En 1906 se abrió otro consultorio de “La Gota de Leche” en Sevilla. Curiosamente en algunos documentos se refiere que “La Gota de Leche” en España se encargaba de recoger y distribuir leche de madre. Por lo tanto, fue la primera experiencia de banco de leche. Pero, como se refiere en la historia de la institución, que actualmente se dedica a la protección de los menores en situación de desventaja, su objetivo era la distribución de leche de vaca procesada (<http://www.gotadeleche.org/>).

A finales del siglo XIX, cuando se empezó a disponer de la tecnología elemental necesaria para realizar los primeros análisis de la leche, comenzaron a desarrollarse las primeras “fórmulas infantiles”. En estos primeros años en los que se procesaba la leche de vaca con procedimientos rudimentarios, prácticamente era cada médico el que diseñaba su propia fórmula y, por tanto, los resultados eran dispares. Los avances tecnológicos permitieron mejorar el procedimiento para procesar la leche de vaca y se desarrollaron las leches condensadas y las fórmulas en polvo que facilitaban su distribución y uso.

En la primera mitad del siglo XX, la medicalización del parto y el cambio en el papel social de la mujer tuvieron como resultado final la sustitución de la leche humana para la crianza de los niños por “fórmulas artificiales”. Hacia 1950 la mayoría de los hospitales, y casi todos los profesionales de la salud en los países desarrollados, promovían la alimentación artificial como el mejor método para alimentar a los niños. Este periodo ha sido denominado por Jelliffe muy acertadamente como “el periodo de destete inducido comercialmente” (Jelliffe y Jelliffe, 1979).

A pesar del gran empuje y respaldo económico que tenían las fórmulas artificiales para la alimentación del lactante, en los años 40, y coincidiendo con la II

Guerra Mundial, se produce la primera gran expansión de los bancos de leche de madre. Las circunstancias económicas, sociales y sanitarias en torno a la II Guerra Mundial promovieron un incremento importante en el número de bancos de leche, especialmente en EE.UU. (Tully, 2000), y la creación de los primeros bancos en muchos países de Europa y otras zonas del mundo. Así, el primer banco de leche se abrió en Gran Bretaña en 1937 (Balmer, 1995), en Dinamarca en 1943, en Brasil en 1943 (Aprigio, 2001), en Suecia en 1944 (Tully, 1991) y en Francia en 1947 (Arnold, 1994). En 1930 los bancos ingleses y alemanes publicaron las primeras recomendaciones a seguir para el desarrollo y funcionamiento de un banco de leche.

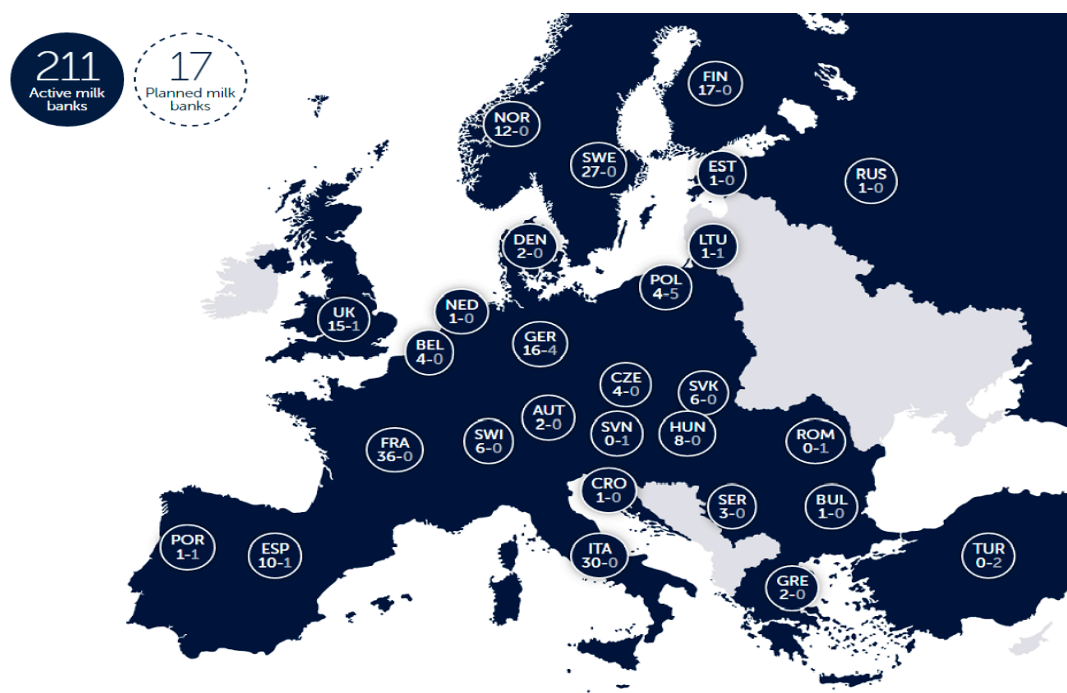
España no formó parte de este movimiento y quedó fuera de todo intento de promoción y preservación de la lactancia materna. Pero fue sensible a la presión comercial de las compañías de fórmulas artificiales lo que, unido a los cambios culturales anteriormente comentados, hizo que la lactancia materna en España declinara de forma alarmante.

Más recientemente, con la aparición del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) y la constatación del paso del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) a través de la leche de madre, los bancos de leche detuvieron su desarrollo y muchos de ellos cerraron por miedo a la transmisión de enfermedades infecciosas. Por otro lado, los profesionales creían que tenían una buena alternativa para el cuidado de los niños prematuros al disponer de fórmulas específicamente diseñadas para ellos.

A principios del siglo XXI, comenzó de nuevo la expansión de los bancos de leche con la aparición de numerosos artículos científicos detallando los beneficios de la lactancia materna para el RN frente al empleo de las fórmulas artificiales (Simmer, 2000; Lucas y Cole, 1990)

Por otro lado, la preocupación por la ausencia de unos protocolos estandarizados hizo que los bancos de leche de Canadá, México y EE.UU. se asociaran en 1985 (HMBANA, del inglés *Human Milk Banking Association of North America*). Uno de los primeros objetivos de esta asociación fue el desarrollo de unos estándares para el desarrollo y funcionamiento de los bancos de leche (West Hartford, 1990). Como resultado de este movimiento, en Europa comenzó a extenderse una política de desarrollo e implantación de bancos de leche. Así surgió la asociación de Bancos de Leche del Reino Unido (UKAMB, del inglés *United Kingdom Association for Milk Banking*) que también editó su guía de actuación (*UK Association for Milk Banking*, 2003). En países como Brasil, esto se hizo a través de una acción conjunta de la Fundación Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) y el *Programa Nacional de Incentivo ao Aleitamento Materno* (PNIAM) que inició el desarrollo de un programa que llevó a crear más de 100 bancos de leche (Gutierre y de Almeida, 1998) y una Red Iberoamericana de Bancos de Leche (IBERBLH) en el año 2005 (*Rede Nacional de bancos de leite humano*; [www.redeblh.fiocruz.br](http://www.redeblh.fiocruz.br)).

El 15 de octubre de 2010 se creó la Asociación Europea de Bancos de Leche (EMBA, del inglés *European Human Milk Bank Association*) como una organización sin ánimo de lucro para promover la creación de bancos de leche en Europa y para mejorar su cooperación internacional y fomentar la investigación con leche donada. En este momento, Europa cuenta con 211 bancos de leche activos y otros 17 en vías de creación, repartidos por diferentes países como se muestra en la Figura 4.



**Figura 4.** Situación actual de los bancos de leche en Europa. Fuente: europeanmilkbanking.com

Actualmente la HMBANA está compuesta por 26 bancos en activo y 5 en desarrollo, de los cuales 3 están en Canadá y el resto en diferentes estados de EE.UU. Entre los principales objetivos de esta asociación se encuentra el mantener actualizadas las guías para el funcionamiento de los bancos de leche, proporcionar un foro para el intercambio de información entre expertos en lactancia materna, promover la investigación e información sobre los beneficios de la leche donada, facilitar la comunicación entre los diferentes bancos miembros de la asociación y las agencias gubernamentales y facilitar el establecimiento de nuevos bancos de leche en Norteamérica.

Mientras que en varias regiones del mundo los bancos de leche fueron cerrando, por temor a la falta de seguridad y al riesgo biológico en relación con el VIH, Brasil vivió un considerable proceso de expansión que ha culminado con la

existencia de más de 200 bancos de leche operativos en la actualidad. Este aumento no revela un incremento espontáneo de la demanda, sino el fruto de esfuerzos dirigidos con inteligencia y coordinados por el PNIAM. El objetivo era capitalizar las acciones a través de la implantación de *Centros de Referência Estaduales*, con sus respectivas Comisiones, que asumieron la implementación local de las políticas establecidas por el Ministerio de la Salud.

Uno de los puntos claves para el éxito de la IBERBLH es el gran esfuerzo realizado para la capacitación de recursos humanos en diferentes países. Como ejemplo, cabe destacar, que el primer encuentro de Bancos de Leche en Brasil reunió alrededor de 150 participantes en 1992 y el segundo congregó unos 300 profesionales en 1995.

La experiencia brasileña se expandió al continente africano gracias a un programa de cooperación técnica y ya se han abierto tres bancos ubicados en Angola, Cabo Verde y Mozambique. En estos países los esfuerzos van dirigidos a reducir la mortalidad por VIH mediante la alimentación del lactante con leche donada pasteurizada.

En otros lugares, como Australia o en el continente asiático, el desarrollo de los bancos de leche ha sido más lento. En Perth (Australia) el primer banco (*Perron Rotary Express Milk Bank*) se abrió en 2006 y en la actualidad sólo operan cuatro bancos más (Thorley, 2012).

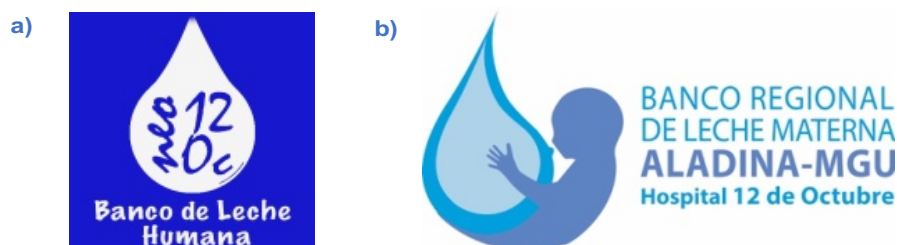
En España, hay doce bancos de leche en funcionamiento ubicados en Palma de Mallorca, Madrid, Valencia, Granada, Barcelona, Zaragoza, Mérida, Valladolid, Vigo, Santiago de Compostela, Sevilla y Asturias. Todos ellos están agrupados en la Asociación Española de Bancos de Leche Humana (AEBLH) que se creó en 2008 con la finalidad genérica de fomentar todas las actividades relacionadas con la obtención, conservación, manipulación y distribución de leche humana para su administración a niños. Sin embargo, a diferencia del resto de países donde la mayoría de los bancos de leche están ubicados en centros hospitalarios, en algunas Comunidades Autónomas españolas el modelo seguido para procesar y distribuir la leche materna funciona bajo los estándares de los Bancos de Sangre, Tejidos y Órganos.

### **III.3.2. Banco Regional de la Comunidad de Madrid**

En el año 2000 surgió en el Servicio de Neonatología del Hospital 12 de Octubre de Madrid la iniciativa de abrir un banco de leche. Entre los años 2000 y 2004 se realizaron visitas a distintos bancos de leche del mundo y se revisó la bibliografía publicada al respecto. En el año 2006, el Ministerio de Sanidad incluyó la donación de leche materna dentro de las líneas financiadas a través de los fondos de cohesión para la mejora de la atención perinatal. La Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid (CAM) valoró positivamente el desarrollo del proyecto del banco de leche

materna y se adjudicaron los fondos suficientes para poner en marcha la iniciativa.

El Banco de Leche del Hospital 12 de Octubre se inauguró el 17 de diciembre de 2007 (Figura 5) y desde el primer trimestre de 2008 hasta la actualidad ha funcionado a pleno rendimiento. Este banco fue el segundo en España y el primero ubicado en un servicio de Neonatología (Vázquez *et al.*, 2009). Dada la falta de uniformidad en las recomendaciones internacionales y la ausencia de legislación al respecto, se decidió seguir el modelo propuesto por la Red de Bancos de Leche de Brasil, la cual procesa anualmente el mayor volumen de leche en el mundo. La formación inicial de los profesionales sanitarios fue posible gracias a la colaboración de los responsables de esta red y, en especial, de su coordinador, Joao Aprigio Guerra de Almeida.



**Figura 5.** Logotipos identificadores de: a) el primer Banco de Leche del Hospital 12 de Octubre; y b) el Banco Regional de Leche Materna Aladina-MGU del Hospital 12 de Octubre.

Durante los dos primeros años de funcionamiento del Banco de Leche del Hospital 12 de Octubre se captaron más de 200 donantes aptas. En el año 2009, la disponibilidad de leche donada permitió que todos los RNs hospitalizados en este Servicio de Neonatología con una edad gestacional menor o igual a 32 semanas iniciasen antes tanto la alimentación enteral (en 47 h) como la alimentación enteral completa (en 101 h), con una reducción media de 75 h en la nutrición parenteral. Además, los pacientes nacidos con menos de 1.500 g prácticamente no recibieron fórmulas artificiales en el primer mes de vida, lo que se tradujo en una disminución significativa del riesgo de NEC (Utrera Torres *et al.*, 2010).

A finales del año 2008, un proyecto concedido por la Fundación de Investigación Biomédica del Hospital 12 de Octubre (referencia 2009-80) permitió financiar la certificación de la actividad del Banco de Leche del mismo hospital según la norma ISO UNE-EN 9001:2008. Dicha certificación se obtuvo el 21 de octubre de 2010 y se mantiene en la actualidad adaptada a la nueva norma ISO 9001:2015.

En el año 2013 se presentó a la CAM el proyecto de transformación del Banco de Leche del Servicio de Neonatología del Hospital 12 de Octubre en Banco Regional

de Leche Materna de la CAM. La Consejería de Sanidad aprobó el proyecto y en el último trimestre de 2013 se inició el proceso de transformación, tras obtenerse financiación de una donante particular a través de la Fundación Aladina. En marzo de 2014, se realizó el traslado a las nuevas instalaciones situadas en la planta baja del edificio Materno Infantil del Hospital 12 de Octubre e inició su andadura como Banco Regional de Leche Materna (BRLM) Aladina MGU de la CAM (en adelante, BRLM).

Desde entonces el BRLM tiene como misión promocionar la donación de leche materna, así como recoger y procesar la leche donada para poder proporcionar un producto seguro y de calidad. Los receptores de esta leche donada son los RN hospitalizados en la CAM con mayor riesgo de NEC, infecciones o problemas intestinales, que no puedan recibir leche de su madre transitoria o definitivamente. De esta forma, se pretende prevenir los riesgos para la salud asociados con la exposición a fórmulas artificiales y acortar en lo posible la duración de la alimentación parenteral.

En el primer semestre de 2014, se planificó la distribución de leche donada a dos centros de la CAM: el Hospital Universitario La Paz y el Hospital Puerta de Hierro-Majadahonda. Posteriormente, se ofreció este servicio a todos los hospitales públicos de la CAM que tuvieran una Unidad de Neonatología con nivel asistencial III; es decir, que disponen de medios adecuados para atender prematuros nacidos con menos de 1.500 g o menos de 32 semanas de gestación (Rite Gracia *et al.*, 2013). El Hospital Universitario Severo Ochoa, el Hospital Clínico San Carlos y el Hospital Universitario Príncipe de Asturias se incorporaron como centros receptores en noviembre de 2014, octubre de 2015 y junio de 2016, respectivamente.

En 2015, para facilitar a las donantes tanto la entrega de leche donada como el procedimiento para hacerse donante, se procedió a acreditar a otros centros para tales fines de acuerdo con los requisitos establecidos en la norma de calidad del BRLM. Los primeros centros recolectores de leche denominados centros satélite son el Hospital Universitario La Paz y el Hospital Universitario Severo Ochoa. Actualmente estos dos últimos, junto con el Hospital Puerta de Hierro-Majadahonda, están en fase de acreditación para poder ser centros de captación y selección de donantes.

Durante el año 2016, en el BRLM se han aceptado como donantes 250 mujeres lactantes y se han procesado 1.525 litros de leche donada que se han distribuido a 598 receptores ingresados en diferentes Unidades de Neonatología. El Hospital Universitario La Paz y el Hospital Universitario 12 de Octubre son los que han precisado un mayor volumen de leche donada para cubrir las demandas de los RN ingresados.



### **III.3.3. Sistema de Gestión de la Calidad del Banco Regional de Leche Materna (BRLM)**

El BRLM ha establecido, documentado e implantado un Sistema de Gestión de la Calidad (SGC) de conformidad con los requisitos de la norma UNE-EN ISO 9001 en sus versiones 2008 y 2015, que mantiene actualizado y mejora continuamente.

El alcance de dicho SGC comprende desde la promoción de la donación en el Hospital 12 de Octubre, o en cualquiera de los centros satélite, hasta la entrega de leche pasteurizada en las Unidades de Neonatología receptoras. Si una parte del proceso de donación se realiza en un centro satélite, también se deben cumplir los requisitos establecidos por el Banco Regional y el centro debe estar certificado para tal fin, según la norma ISO 9001 en la versión vigente. El SGC del BRLM no aplica el requisito 7.3 de la norma en la versión 2008 ni el 8.3 de la versión 2015, relativos al diseño y desarrollo ya que, por el momento, los servicios que presta siguen los métodos que marca el estado actual del conocimiento científico.

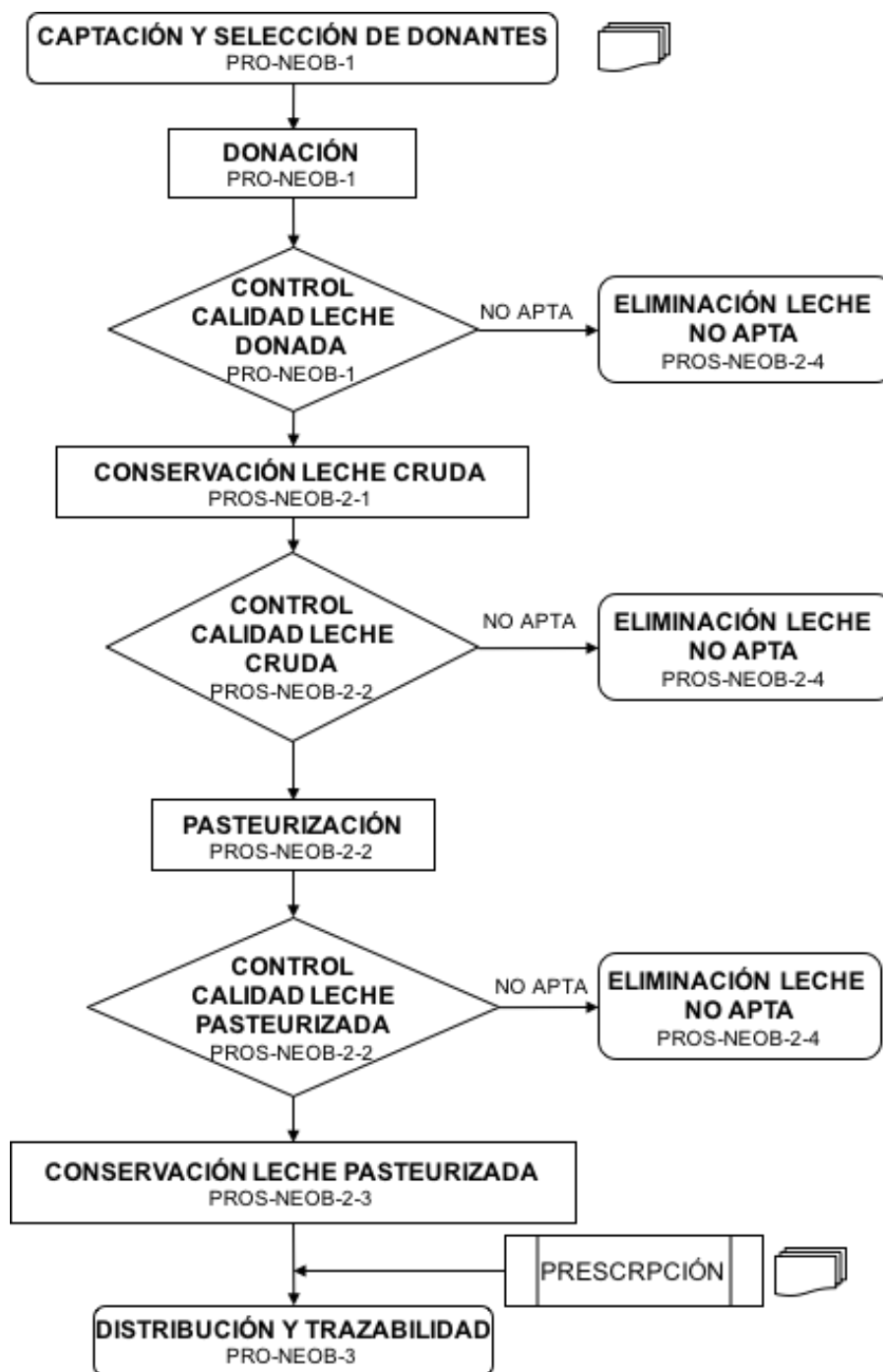
Este sistema se fundamenta en la gestión de procesos, para lo cual se han llevado a cabo los siguientes requisitos:

- Determinar los procesos, tanto de gestión como asistenciales, necesarios para el Sistema de Gestión de la Calidad.
- Determinar la secuencia e interacción de estos procesos.
- Determinar los recursos, métodos y criterios para asegurar el funcionamiento efectivo y el control de los procesos.
- Asegurar la disponibilidad de información a los profesionales para apoyar el funcionamiento y el seguimiento de los procesos.
- Medir y analizar los procesos identificados.
- Implantar las acciones necesarias para lograr los resultados planificados y la mejora continua.

Los procesos del BRLM de la CAM se clasifican en operativos, estratégicos y de apoyo, según como se muestra en la Tabla 10. El diagrama de flujo de los procesos operativos, desde la captación de donantes hasta la distribución y trazabilidad se describe con detalle en la Figura 6. El BRLM también cuenta con el apoyo de otros Servicios del hospital como son el Servicio Técnico, el Servicio de Medicina Preventiva y el Servicio de Prevención de Riesgos Laborables.

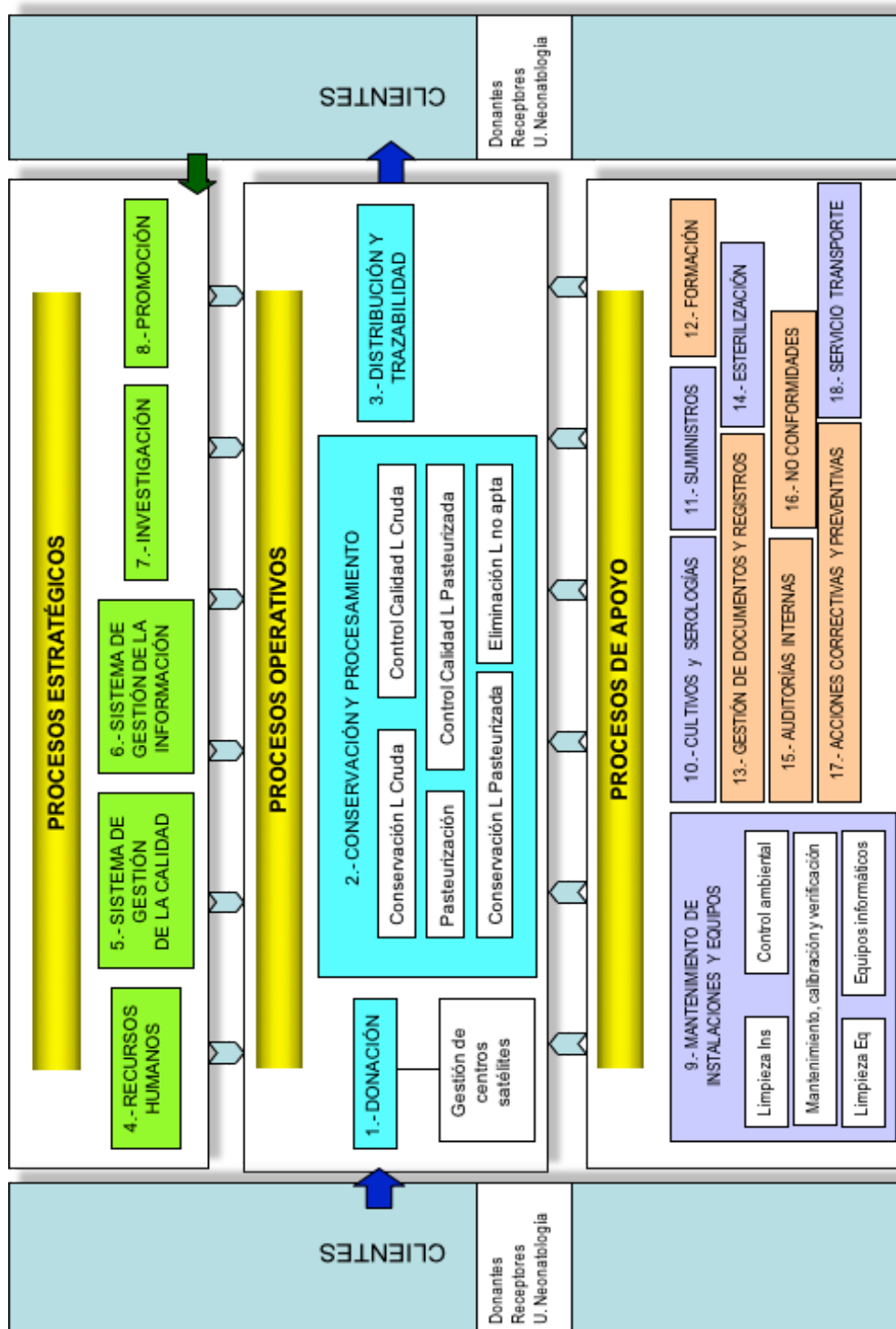
**Tabla 10.** Descripción de los procesos del BRLM.

<b>PROCESOS OPERATIVOS</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Donación:</b> captación y selección de donantes, proceso de donación y control de calidad y conservación de la leche donada</li> <li>- <b>Conservación y procesamiento:</b> controles de calidad y conservación de la leche cruda y pasteurización</li> <li>- <b>Distribución y trazabilidad</b></li> <li>-</li> </ul>
<b>PROCESOS ESTRATÉGICOS</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Recursos humanos</li> <li>- Sistema de gestión de la calidad</li> <li>- Sistema de gestión de la información</li> <li>- Investigación</li> <li>- Promoción</li> </ul>
<b>PROCESOS DE APOYO</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mantenimiento, a cargo de los Servicios Generales, el Servicio de Electromedicina y el Servicio de Informática. Comprende los subprocesos de: <ul style="list-style-type: none"> <li>limpieza de instalaciones</li> <li>limpieza de equipos</li> <li>mantenimiento, verificación y calibración de equipos</li> <li>mantenimiento de equipos informáticos, y control ambiental.</li> </ul> </li> <li>- Cultivos microbiológicos y pruebas serológicas de las donantes, a cargo del Servicio de Microbiología</li> <li>- Suministros, a cargo del Servicio de Suministros</li> <li>- Formación</li> <li>- Control de documentos</li> <li>- Esterilización, a cargo del Servicio de Esterilización</li> <li>- Auditorías internas</li> <li>- No conformidades</li> <li>- Acciones correctivas y preventivas</li> <li>- Servicio de transporte</li> </ul>



**Figura 6.** Diagrama de flujo de los procesos operativos. Fuente: Manual de calidad del BRLM (2016).

La secuencia e interrelación de los procesos mencionados anteriormente se recoge en el mapa de procesos que muestra la Figura 7.



**Figura 7.** Mapa de procesos del BRLM. Fuente: Manual de calidad del BRLM (2016).

Todos estos procesos están encaminados a proporcionar tanto a las donantes de leche como a los receptores de esa leche donada y sus tutores legales, incluyendo las Unidades de Neonatología receptoras, la máxima satisfacción con el servicio recibido. Dada la importancia que tiene este aspecto en el SGC se han establecido métodos para realizar una evaluación constante de la satisfacción.

Para asegurar el funcionamiento correcto de los procesos operativos se ha empleado el Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC), ampliamente usado en la industria alimentaria, como método preventivo para garantizar la inocuidad de la leche donada que se va a distribuir a las Unidades de Neonatología. También se han revisado y tomado en consideración las recomendaciones publicadas en guías internacionales sobre bancos de leche y otros artículos científicos relacionados con la seguridad y calidad de la leche materna (Human Milk Banking Association of South Africa, 2011; French Human Milk Bank Association, 2008; National Institute for Health and Clinical Excellence, 2010; Arslanoglu, 2010; Human Milk Bank Association of North America, 2015).

En este análisis se han identificado como puntos críticos los siguientes procedimientos:

- La captación y la selección de las donantes
- Las condiciones de extracción de la leche para donar
- La conservación de la cadena de frío, tanto en refrigeración como en congelación
- La pasteurización
- La trazabilidad del donante y el receptor

Del mismo modo, se han definido una serie de indicadores y objetivos de cumplimiento de dichos procesos operativos para evaluar y realizar un seguimiento constante. Todos los procesos estratégicos y de apoyo tienen establecidos sistemas de registro y seguimiento como son, entre otros, los resultados de las auditorías internas, las reclamaciones, las no conformidades y los resultados de la satisfacción de los donantes y receptores.

### **III.3.3.1. Donación**

#### **III.3.3.1.1. Captación y selección de las donantes**

Para dar a conocer la información relativa a la donación se suele recurrir a diversos recursos y medios, como por ejemplo los profesionales sanitarios de Atención Primaria y de los centros receptores, así como los de los centros satélite, las

asociaciones de apoyo a la lactancia y la Asociación de Iniciativa para la Humanización del Parto y la Lactancia (IHAN), carteles informativos, páginas web como la del BRLM ([www.madrid.org/hospital12octubre/bancodeleche](http://www.madrid.org/hospital12octubre/bancodeleche)), campañas publicitarias en medios de comunicación de masas dirigidas por el Gabinete de Comunicación del Hospital y redes sociales (WhatsApp, Facebook).

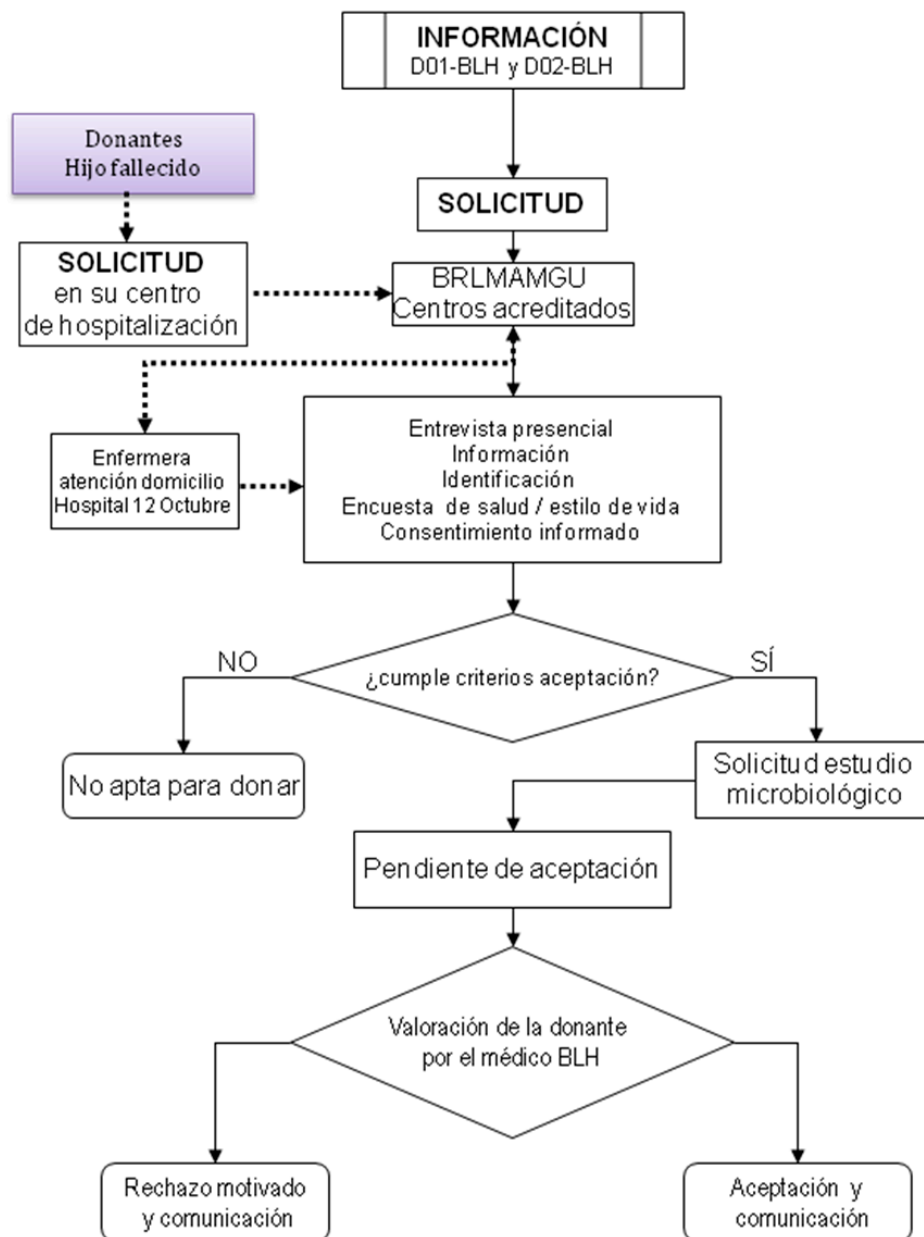
Los criterios prioritarios que debe cumplir una mujer para hacerse donante de leche son tener un buen estado de salud y un estilo de vida saludable, estar amamantando al propio hijo satisfactoriamente y querer donar su excedente de leche de forma voluntaria y altruista.

Los criterios de exclusión principales son el consumo de tóxicos (drogas, tabaco, alcohol o cafeína en exceso), la ingesta de ciertos medicamentos o productos de parafarmacia, así como algunas infecciones, cirugías o transfusiones de productos sanguíneos. Además, es requisito fundamental una entrevista personal con un profesional sanitario del BRLM, rellenar una encuesta de salud y hábitos de vida para descartar cualquier incompatibilidad y firmar un consentimiento informado. Los criterios de exclusión temporal y definitiva empleados en el BRLM se detallan en los Anexos I y II, respectivamente.

En el caso de que se cumplan todos los criterios previos, se solicitará a la madre un análisis de sangre para descartar las siguientes enfermedades: hepatitis B, hepatitis C, infección por el VIH de tipo 1 y 2 (VIH-1 y VIH-2), así como por el virus linfotrófico de células T humanas de tipo I y II (HTLV-I y HTLV-II; exclusivamente en el caso de que ella o su pareja procedan de áreas endémicas como Centroamérica, Sudamérica, África, Australia, Japón e Irán). Cuando la mujer lactante disponga de dichos resultados por análisis previos, éstos se consideraran válidos siempre y cuando no haya pasado más de un mes desde su realización y el momento de la donación y se pueda aportar un informe escrito, con identificación del laboratorio donde se ha realizado, fecha y tipo de técnicas empleadas.

En la Figura 8 se detalla el diagrama de flujo que se sigue para el proceso de selección de una mujer lactante como donante de leche.

### Diagrama de flujo del proceso “DONACIÓN” Parte I: selección de donantes



**Figura 8.** Diagrama de flujo del proceso de selección de donantes. Fuente: Manual de calidad del BRLM (2016).

### III.3.3.1.2. Extracción, transporte y conservación de leche cruda

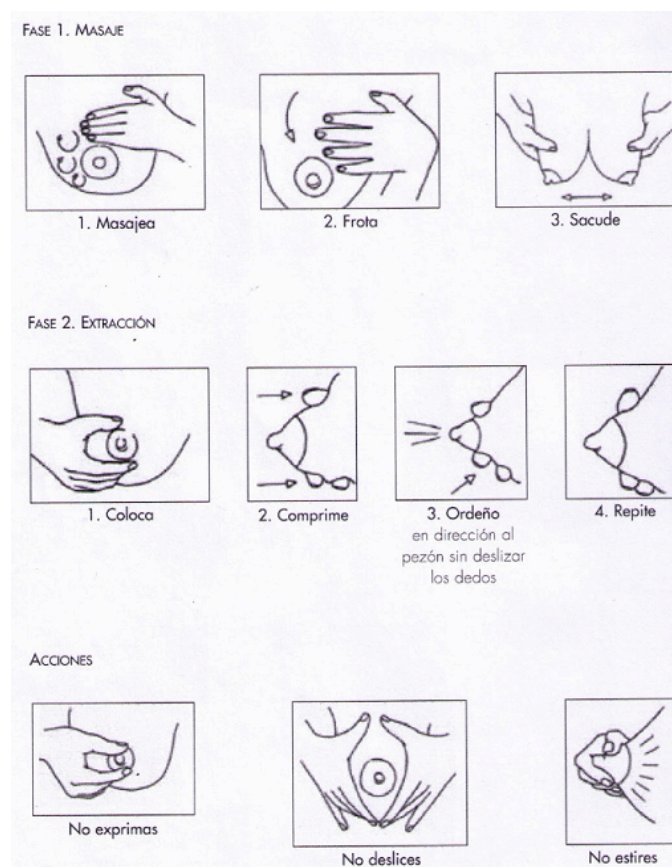
Las medidas de higiene que deben seguir las donantes para la extracción de leche contemplan el lavado de manos y uñas con agua y jabón (Figura 9), recogerse el pelo con un gorro y colocarse una mascarilla. Para la higiene del pecho es suficiente el aseo diario. No se recomienda el uso de cremas para la zona del pecho y pezón.



**Figura 9.** Técnica para una correcta higiene de manos. Fuente: CAM, Observatorio Regional de Riesgos Sanitarios y Plan de Calidad para el Sistema Nacional de Salud, disponible en <http://www.madrid.org>.



La extracción de leche para donar puede realizarse de forma manual (“técnica de Marmet”) como se indica en la Figura 10 o con sacaleches manual o eléctrico, según la preferencia de la mujer. Si se emplea un sacaleches, es muy importante realizar un cuidadoso lavado con agua y jabón y la esterilización previa a su uso (mediante cocción durante 15 minutos o con el empleo de bolsas específicas para la esterilización en un horno microondas).



**Figura 10.** Extracción manual de leche mediante la técnica Marmet. Fuente: Asociación Española de Pediatría (AEP, 2004).

Para la recogida de la leche se proporcionan recipientes estériles y etiquetas personalizadas donde la donante tiene que anotar el volumen de leche extraída y la fecha de extracción. Dichos recipientes se deben congelar inmediatamente o se pueden mantener en refrigeración en el caso de que se vayan a entregar en menos de 24 h al BRLM. Durante la conservación en el domicilio es recomendable disponer de un congelador con cajones separados para evitar el contacto de los recipientes de leche con otros alimentos. Para realizar el traslado de la leche almacenada hasta el BRLM o los centros satélites acreditados, ésta debe ir en recipientes aislados de calidad con

acumuladores de frío previamente congelados para evitar que se rompa la cadena de frío.

Durante la recepción de la leche en las instalaciones del banco se comprobará si los envases, el etiquetado, la conservación y el transporte han sido adecuados. No se aceptarán envases de materiales no aptos para el contacto con alimentos o que no estuvieran estériles antes de la recolección ni recipientes que no dispongan de una tapa íntegra o que contengan cuerpos extraños o una coloración anómala de la leche. Igualmente, cualquier recipiente sin identificación adecuada o descongelado durante el transporte será descartado.

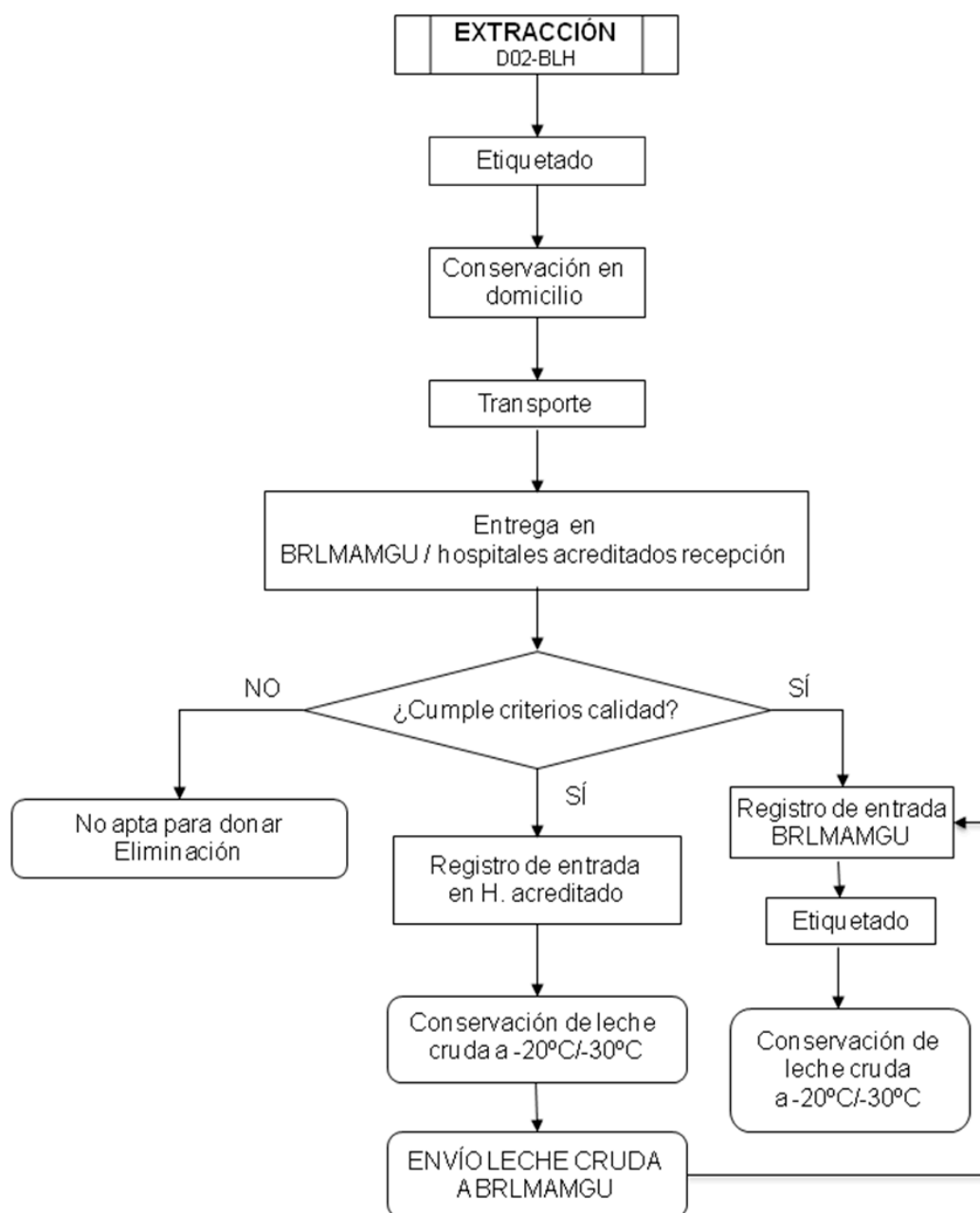
Tras este primer control de calidad, los profesionales sanitarios registran la leche apta en la base de datos y la etiquetan para ser almacenada en congeladores a -20°C destinados para tal fin en las instalaciones del BRLM. Todos los congeladores de este centro disponen de una lectura externa continua de temperatura con una alarma preestablecida a -17°C. Así mismo, se dispone de un generador alternativo que entra en funcionamiento automáticamente ante un fallo de corriente. Las alarmas de dichos congeladores se comprueban diariamente, registrándose dicha comprobación. La verificación técnica de los congeladores se realiza anualmente.

La leche cruda con una fecha de extracción igual o superior a seis semanas (42 días) se considera caducada y se rechazará.

La leche donada almacenada en los centros satélites acreditados para tal fin se enviará al BRLM periódicamente, coincidiendo con los días en los que se sirva un pedido de leche pasteurizada. Todos los envíos irán acompañados de un albarán con la información detallada de los recipientes de leche.

El diagrama de flujo del proceso de donación, en lo que respecta a los procedimientos de extracción, conservación, transporte y registro de entrada en el BRLM, se muestra en la Figura 11.

### Diagrama de flujo del proceso “DONACIÓN” Parte II: donación



**Figura 11.** Diagrama de flujo proceso de donación. Fuente: Manual de calidad del BRLM (2016).

### III.3.3.1.3. Plan de acreditación de centros satélites

Como se comentaba anteriormente, en el caso de que la recepción de leche o la selección de donantes se lleven a cabo en un centro satélite, el BRLM es responsable de la formación y certificación de los profesionales designados por los centros, así como de la monitorización continua de los mismos.

Sólo los centros satélites que hayan sido acreditados para recolectar leche de las donantes y que estén funcionando satisfactoriamente en cuanto a la recepción de la misma durante un periodo no inferior a 3 meses, podrán optar a acreditarse como centros de captación y selección de donantes de leche. Las etapas para la acreditación de los centros satélite para la recepción de la leche donada (Fase I) y la captación y aceptación de donantes (Fase II) se detallan en los Anexos III y IV, respectivamente.

### III.3.3.2. **Conservación y procesamiento**

#### III.3.3.2.1. Controles de calidad de la leche donada antes de la pasteurización

Una vez seleccionados los recipientes de leche cruda que se van a pasteurizar, se descongelan en un baño térmico a 40°C y con agitación constante. Para evitar el sobrecalentamiento de la leche, un profesional del BRLM revisa constantemente dicho procedimiento para dar por finalizado el mismo cuando quede aproximadamente el tamaño de una nuez en hielo.

A continuación, se realiza un control del olor de cada recipiente de leche en el interior de una cabina de flujo laminar. Para ello el personal sanitario debe estar entrenado previamente para poder descartar muestras con aromas anómalos indicativos de la degradación o mal estado de la leche (a rancio, a pescado, a medicina u otros) (Novak *et al.*, 2008). Este profesional no deberá padecer inflamación de la mucosa nasal, comer ni fumar en los 30 minutos previos al cribado. Tampoco podrá utilizar perfumes o cosméticos, ya que estos productos pueden enmascarar el olor de la leche.

Los recipientes de una misma donante que hayan superado dicho control se mezclan en un matraz estéril constituyendo un lote. Del mismo se extraen dos alícuotas de leche para determinar, en una, la acidez Dornic y, en otra, el valor nutricional.

La acidez Dornic es una medida de la acidez total de la leche, conformada por su acidez natural debida a las caseínas, sales, fosfatos o ácidos orgánicos y por la posible acidez desarrollada por la fermentación de la lactosa a ácido láctico por el crecimiento excesivo de microorganismos o por la degradación de los lípidos (Vázquez *et al.*, 2013). De hecho, en la leche pasteurizada el aumento de la acidez Dornic durante su conservación en congelación es más lento en comparación con la leche cruda como consecuencia de la destrucción de las bacterias presentes en la misma y de la inactivación de sus lipasas (Vázquez *et al.*, 2016). El control de la

acidificación de la leche es importante, por otro lado, porque provoca una disminución de las células somáticas, la actividad lipasa y la concentración total de proteína (Erickson *et al.*, 2013). Además, una acidez excesiva desnaturaliza las caseínas y provoca su precipitación dando lugar a una leche que será inestable cuando se trate térmicamente (McMahon, 2009). De este modo, la medida de acidez de la leche donada es un indicador de su calidad, tanto nutricional y microbiológica como tecnológica.

La medida de la acidez Dornic se hace con una técnica de valoración muy sencilla basada en una reacción ácido-base que mide el volumen de una solución de NaOH 0.111 mol/L, conocida como solución Dornic, necesario para neutralizar los grupos ácidos. Como indicador del punto final de la valoración se emplea fenolftaleína al 1%, que cambia de incoloro a rosa a pH 8,3. Los resultados se expresan como grados dornic (°D), correspondiendo cada 10 µL de solución Dornic empleados a 1 °D. Los lotes de leche donada con 7 °D o menos de acidez, son aptas para ser pasteurizadas. Aunque dicha técnica es la más empleada en el BRLM y otros bancos a nivel nacional e internacional, especialmente en la Red Brasileña de Bancos de Leche, existen otras técnicas para determinar la acidez, como la medida del pH de la leche, pero se desconoce que correlación tiene con los grados Dornic.

La determinación del valor nutricional del lote de leche en el BRLM se lleva a cabo mediante un analizador de leche (MilkoScan FT2, FOSS) que utiliza el análisis con infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*). Este equipo permite determinar con mucha rapidez y en un volumen pequeño de leche la concentración total de grasa, proteína y lactosa en la leche donada. Para realizar una verificación externa de los parámetros de calibración del equipo se realiza el análisis de muestras de leche en un laboratorio externo de referencia.

Antes de la pasteurización de la leche donada mediante el método Holder, que se detalla a continuación, el lote de leche analizado se distribuye en fracciones con un mismo volumen, que suele ser de 30, 60, 120 ó 240 mL, en recipientes estériles de cristal. De esta forma se intentan abarcar las distintas necesidades de los RNs ingresados en las Unidades de Neonatología. Las características del lote de leche quedan registradas en la base de datos del BRLM y cada alícuota de leche donada se etiqueta con un código de barras y la información relativa a su acidez Dornic, valor nutricional y fecha de caducidad.

#### III.3.3.2.2. Pasteurización y control de calidad de la leche pasteurizada

La pasteurización de la leche donada se realiza en la mayoría de los bancos de leche mediante el método Holder. Se trata de una pasteurización por lotes (en

discontinuo) que consiste en calentar la leche a 62,5°C durante 30 minutos, enfriándola después hasta, al menos, 4 °C.

Este tratamiento térmico se realiza en baños termostáticos dotados con un sistema de agitación constante que tienen capacidad para unos 24 recipientes de 240 mL de capacidad máxima; es decir, permiten procesar como máximo 5,7 L de leche donada. Es habitual emplear un baño para el calentamiento y otro para el enfriamiento. A este último se le añade hielo en escamas para acelerar y acortar el enfriamiento lo máximo posible.

Para monitorizar la temperatura de este proceso se coloca una sonda en el interior de un recipiente con leche (“testigo de temperatura”), que normalmente se coloca en la posición central del baño termostático. Dicha sonda, que está conectada a un termómetro que transmite los datos en tiempo real, tiene una precisión de medición de temperatura de  $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ . Los datos que ha recogido el termómetro conectado al testigo de temperatura se descargan mediante un programa informático para comprobar que el procedimiento de pasteurización ha sido correcto.

Se considera que la pasteurización es correcta cuando la curva de temperatura asciende rápidamente (en menos de 20 minutos) hasta los 62°C, se mantiene estable entre 62°C y 64°C durante 30 minutos y, posteriormente, desciende rápidamente (en menos de 20 minutos) hasta 4°C o una temperatura inferior. La pasteurización se considerará válida si la temperatura del testigo durante el procedimiento cumple cualquiera de los criterios recogidos en la Tabla 11.

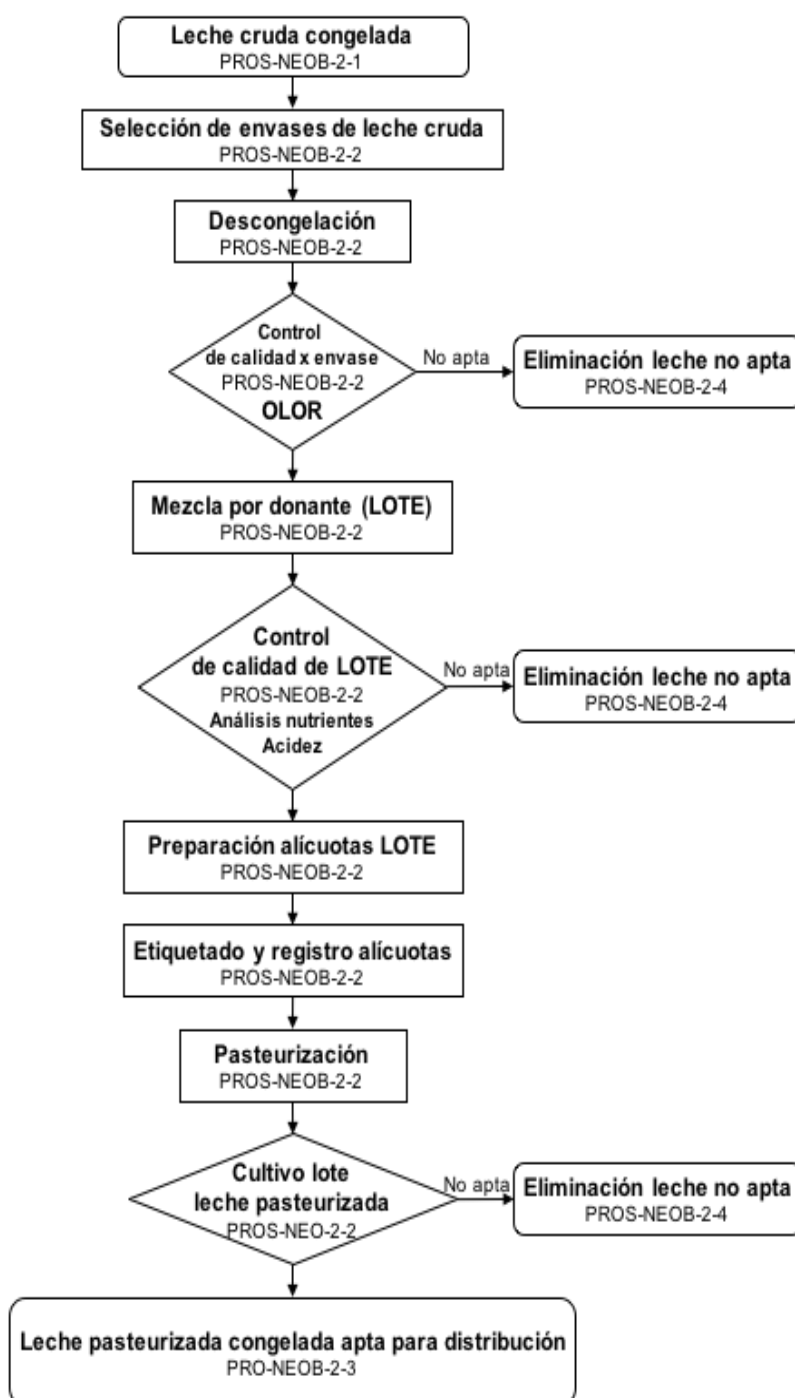
**Tabla 11.** Márgenes de variación permitidos en los parámetros de proceso durante la pasteurización Holder

Temperaturas y tiempos fuera de 62-64°C	Tiempo de pasteurización entre 62-64°C
$66^{\circ}\text{C} \leq 2 \text{ min y } 65^{\circ}\text{C} \leq 3 \text{ min}$	$\geq 25 \text{ min}$
$65^{\circ}\text{C} \leq 5 \text{ min}$	$\geq 25 \text{ min}$
$60 - 61^{\circ}\text{C} \leq 5 \text{ min}$	$\geq 25 \text{ min}$

Las curvas de pasteurización que excedan de estos márgenes se considerarán no válidas y, por tanto, se procederá a desechar los lotes afectados.

Finalmente, para comprobar que el tratamiento térmico ha sido eficaz en cuanto a la destrucción de las bacterias presentes inicialmente en el lote de leche cruda, se tomará una muestra en condiciones estériles para su análisis microbiológico. Para dicho control se emplean placas de agar sangre, un medio de cultivo que facilita el crecimiento de microorganismos exigentes y que es adecuado para el crecimiento de

muchas bacterias Gram-positivas, y de agar Mac Conkey, especialmente diseñado para el recuento de enterobacterias. El criterio microbiológico para considerar un lote apto para su distribución a los RNs ingresados en las Unidades de Neonatología que lo precisen es ausencia de crecimiento en las condiciones de incubación (37°C durante 24-48 h), aceptándose un recuento de  $\leq 5$  unidades formadoras de colonias ( ufc) de *Bacillus* sp. en 10 µL de leche. Además, tras la pasteurización una pequeña alícuota del lote procesado se congela a -20°C y se conserva almacenada a esa temperatura durante un año, por si fuera necesario investigar algún efecto tóxico o transmisión de enfermedad infecciosa. En la Figura 12 se muestra el diagrama de flujo donde se reflejan los controles de calidad que se llevan a cabo en todos los lotes de leche donada hasta su almacenamiento en congelación. El periodo de caducidad establecido para la leche pasteurizada es de 3 meses cuando se mantiene su almacenamiento en congelación a -20°C.



**Figura 12.** Diagrama de flujo de los controles de calidad de la leche cruda y pasteurizada. Fuente: Manual de calidad del BRLM (2016).





**Figura 13.** Imágenes de los controles de calidad de la leche cruda y de la pasteurización Holder en el BRLM

### III.3.3.3. Distribución y trazabilidad de la leche donada pasteurizada

Las Unidades de Neonatología de la CAM que reciben leche donada pasteurizada del BRLM deben disponer de un protocolo para su procesamiento que, además, debe estar certificado por la norma ISO 9001:2015.

La leche pasteurizada se distribuye correctamente etiquetada y conservada en frío a los hospitales receptores que la soliciten a través de un pedido. Los profesionales del BRLM son los responsables de evaluar las necesidades de cada centro, seleccionar los envases adecuados, registrarlos y prepararlos para el transporte.

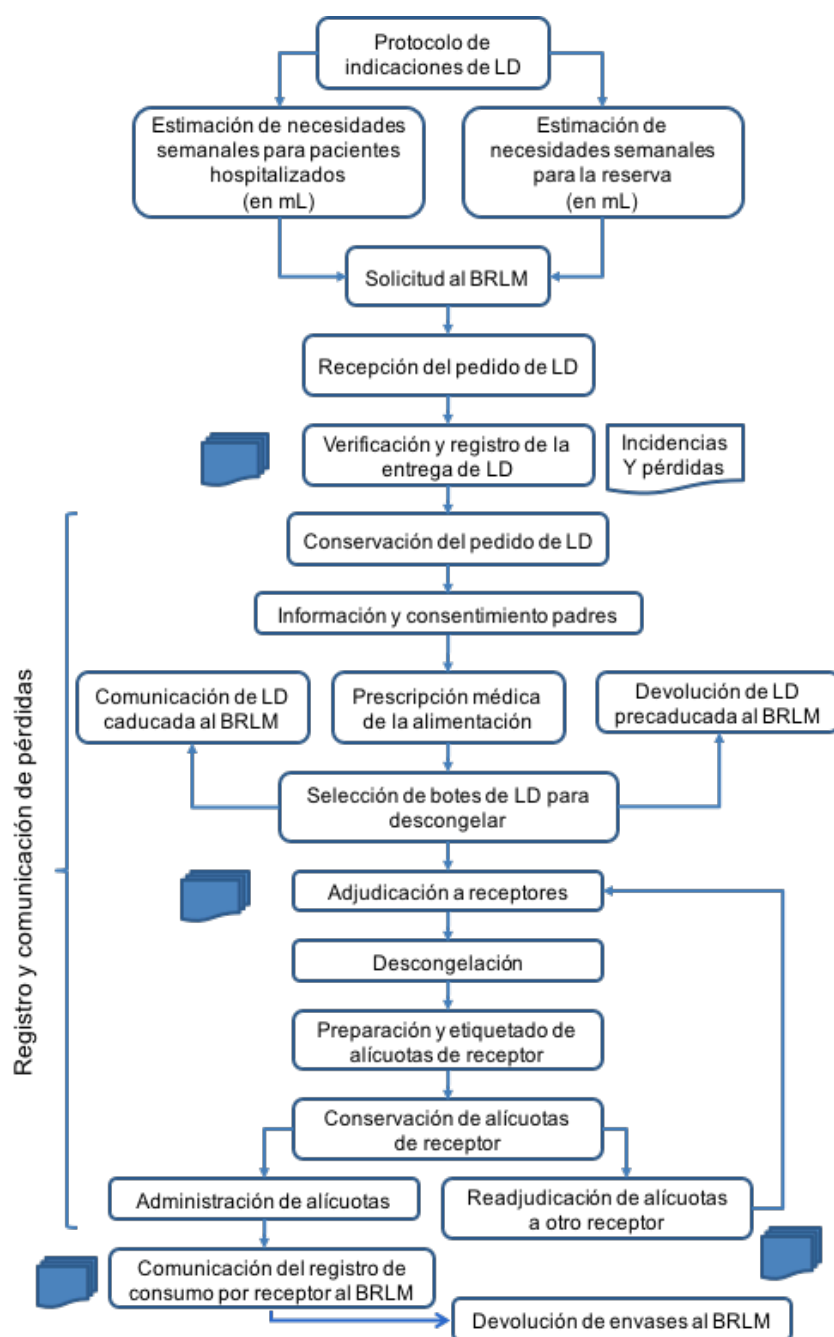
El transporte de los pedidos se lleva a cabo por una empresa especializada en el transporte de muestras biológicas, en condiciones seguras y manteniendo la cadena de frío. El centro receptor controla y verifica la adecuación de cada entrega de pedido y comunica al BRLM cualquier incidencia. En el caso especial del Servicio de Neonatología del Hospital 12 de Octubre, la distribución es directa, al encontrarse el BRLM dentro del mismo hospital.

Los receptores de la leche donada pasteurizada son RNs con menos de 32 semanas de gestación o con un peso inferior a de 1.500 gramos o con antecedente de bajo gasto sistémico (parada cardiorrespiratoria que precise reanimación avanzada, en situación de shock de cualquier etiología, asfixia perinatal, cardiopatía congénita con flujo sistémico comprometido). También son receptores de esta leche aquellos niños en los que hay que volver a introducir la alimentación tras un postoperatorio de cirugía intestinal o cardíaca en período neonatal, hasta alcanzar la tolerancia digestiva. El BRLM puede autorizar otras indicaciones de forma excepcional. Pero, además, para administrar leche donada a un RN, debe informarse previamente a los padres o tutores legales y obtener el consentimiento por escrito de, al menos, uno de ellos.

En aquellas ocasiones en que exista un déficit para cubrir las necesidades de leche pasteurizada donada de todas las unidades que lo soliciten, se priorizará el abastecimiento para los RNs con menos de 28 semanas de gestación o menos de 1.000 gramos, hasta pasadas 6 semanas de vida. Siempre se contempla la posibilidad de tener una pequeña reserva de leche (1 ó 2 litros) en todas las unidades para cubrir necesidades imprevistas de pacientes hospitalizados o de nuevos pacientes ingresados durante las guardias o en los días festivos.

El volumen de leche que hay que administrar a los RNs muy prematuros, o enfermos, en sus primeros días de vida suele ser muy pequeño. Por ello, para evitar pérdidas de leche pasteurizada existe la posibilidad de administrar un recipiente de leche a varios RNs siempre y cuando se mantenga la trazabilidad. Una vez descongelada la leche pasteurizada se conserva durante un máximo de 24 h en refrigeración.

La trazabilidad de donante a receptor es un requisito prioritario durante todo el proceso y los centros receptores deben comprometerse a ello aportando al BRLM los datos de las alícuotas administradas a cada receptor. En la Figura 14 se muestra el algoritmo que se sigue en la distribución de leche pasteurizada a las Unidades de Neonatología y en su posterior administración.



**Figura 14.** Esquema de la distribución de leche pasteurizada a las Unidades de Neonatología. Fuente: Manual de calidad del BRLM (2016).

### III.4. EFECTOS DE LA PASTEURIZACIÓN HOLDER EN LA LECHE DONADA

La pasteurización ha sido durante mucho tiempo uno de los métodos más habituales para reducir el riesgo de transmisión de patógenos a través de los alimentos, entre ellos los productos lácteos, y prolongar la vida útil de los mismos. Con este método de conservación se consigue la destrucción de todos los microorganismos patógenos no esporulados presentes en la leche y una reducción sustancial del resto de microorganismos. Tiene el inconveniente de que el calor empleado para la destrucción de esos microorganismos también altera algunos componentes nutritivos y con actividad biológica que se encuentran en la leche. Esta técnica fue inventada por el confitero francés Nicolás Appert en 1831 (Nikodémusz, 1987) y posteriormente aplicada por el bacteriólogo, también francés, Louis Pasteur en 1865 para la pasteurización del vino, la cerveza y la leche (Cordero-Moreno, 1992). Fue este último quien relacionó el efecto conservante de la pasteurización con la destrucción de los microorganismos presentes en el alimento. Desde entonces, la industria alimentaria ha desarrollado diferentes técnicas para el tratamiento térmico de los alimentos con el fin de alargar su vida útil sin deteriorar su calidad nutricional.

En la mayoría de los bancos de leche la técnica de pasteurización referenciada en las guías clínicas de leche donada (Human Milk Banking Association of South Africa, 2011; French Human Milk Bank Association, 2008; National Institute for Health and Clinical Excellence, 2010; Arslanoglu, 2010; Human Milk Bank Association of North America, 2015) es el método Holder. Este método consiste en calentar la leche a baja temperatura (62,5°C) durante un tiempo relativamente prolongado (30 minutos). En la industria láctea este proceso se conoce como LTLT (del inglés, *Low-Temperature Long-Time*).

La pasteurización Holder ofrece un buen compromiso entre la seguridad microbiológica y la preservación de los componentes nutritivos de los alimentos. Sin embargo, dicho tratamiento provoca la pérdida o disminución de algunos compuestos con actividad biológica presentes en la leche materna (Peila *et al.*, 2016). El impacto de la pasteurización Holder en estos compuestos se ha evaluado exhaustivamente en los últimos años para tratar de mejorar la calidad de la leche donada que se ofrece a los RNs prematuros o enfermos. Sin embargo, en general, dichos estudios se han realizado en diferentes condiciones experimentales, dando lugar a resultados dispares, que, en definitiva, se traducen en una falta de consenso. Este hecho se refleja en la amplia variedad de métodos y/o condiciones descritos en las guías de actuación de los bancos de leche publicadas en diversos países.

Estas discrepancias pueden explicarse por diversos factores como son el tipo de leche que se emplea (de madres de niños nacidos a término o prematuros) o del periodo de la lactancia en el que se han obtenido (calostro/leche intermedia/leche

madura), la variabilidad de las técnicas analíticas empleadas o las condiciones de almacenamiento de las muestras. Otras fuentes importantes de variabilidad son el volumen de leche donada utilizado y el tiempo empleado en alcanzar las temperaturas de calentamiento y enfriamiento. De hecho, en la mayoría de los estudios experimentales publicados los resultados se han obtenido al tratar pequeñas alícuotas (5-40 mL), que no se corresponden con el volumen de leche que se procesa normalmente en los bancos de leche (100-250 mL/recipiente) (Picaud y Buffin, 2017). Por ello, en condiciones reales se espera una mayor pérdida de algunos componentes de la leche donada debido a que se requiere un tiempo más largo de calentamiento para alcanzar la temperatura deseada en el centro del recipiente.

A continuación, se detalla el efecto en la composición microbiológica, nutricional, inmunológica y bioquímica de la leche donada descrito hasta el momento tras la pasteurización Holder.

### **III.4.1. Efecto en la calidad microbiológica**

Además de una microbiota específica, procedente de la glándula mamaria y compuesta principalmente por bacterias de los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Corynebacterium*, la leche donada también puede contener otras bacterias Gram-negativas que, con frecuencia, están asociadas al empleo de sacaleches o del agua potable empleada para su limpieza. Esto se debe a que la eliminación de estas bacterias no suele ser eficaz con los protocolos habituales de limpieza de estos dispositivos (Fernández *et al.*, 2013; Jeurink *et al.*, 2013; Marín *et al.*, 2009). Por otra parte, ocasionalmente se ha descrito que la leche de la propia madre ha sido vehículo de microorganismos patógenos, como *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp., *Serratia* sp. o citomegalovirus (CMV), causando infecciones de especial relevancia clínica en niños prematuros o de muy bajo peso que se encontraban ingresados en una unidad neonatal (Godambe *et al.*, 2005.; Nakamura *et al.*, 2016).

La pasteurización Holder es capaz de destruir la mayoría de las bacterias no esporuladas presentes en la leche materna (Landers y Updegrove, 2010). Igualmente, se ha demostrado que este tratamiento inactiva muchos virus patógenos que se pueden transmitir a través de este fluido biológico como son el VIH, el CMV, el virus del papiloma humano, el HTLV, el virus herpes simplex, el virus de la rubeola y el virus de la hepatitis A. Más recientemente se ha comprobado su eficacia contra el virus del Ébola, el virus de Marburgo y el virus del Zika (Chiavarini *et al.*, 2011; Donalisio *et al.*, 2014; Hamilton Spence *et al.*, 2017; Orloff *et al.*, 1993; Pfaender *et al.*, 2017; Rigourdt *et al.*, 2011;).

Sin embargo, las bacterias esporuladas como las pertenecientes al género *Bacillus* pueden resistir las condiciones empleadas durante la pasteurización (Segura *et al.*, 2012). Por ello, podrían llegar a causar enfermedad en pacientes inmunodeprimidos como los prematuros (Tuladhar *et al.*, 2000). Pero, hasta el momento, no se han descrito



infecciones severas en este grupo de riesgo, excepto un caso clínico en el que existía sospecha de infección intestinal por la ingesta de leche donada conteniendo toxinas de *Bacillus cereus* (Decousser *et al.*, 2013). Por ello, en las Unidades de Neonatología es de especial relevancia establecer protocolos para el manejo de la leche materna, de tal forma que se evite que esta bacteria genere toxinas capaces de provocar problemas en el RN.

Asímismo, debe tenerse en cuenta que la pasteurización Holder permite reducir una determinada carga microbiológica en un determinado porcentaje, dependiendo de la termorresistencia de los microorganismos presentes (Pardou *et al.*, 1994). En consecuencia, si la calidad microbiológica de la leche donada cruda es deficiente y los recuentos totales iniciales presentes son elevados será posible encontrar microorganismos supervivientes tras este tratamiento térmico. Por ello, en la mayoría de los bancos de leche se han establecido unos criterios microbiológicos similares para descartar la leche con una calidad microbiológica deficiente antes de la pasteurización. En este sentido, los lotes de leche que contengan más de  $10^5$  ucf/mL de bacterias totales o más de  $10^4$  ucf/mL de *Staphylococcus aureus* o enterobacterias no se procesan térmicamente.

Además, para comprobar que el tratamiento térmico ha sido eficaz en cuanto al objetivo de destrucción microbiológica, en casi todos los bancos de leche se realizan controles microbiológicos de manera rutinaria en la leche después de la pasteurización. Por norma general, se descarta la leche pasteurizada en la que se detecta crecimiento de cualquier microorganismo, excepto en el caso de *Bacillus* sp., para el que se permiten  $<10^3$  ufc/mL en algunos bancos de leche como el BRLM.

Actualmente no existe un criterio común para todos los bancos de leche en cuanto a la calidad microbiológica de la leche donada antes y después de su pasteurización (Tablas 12 y 13). Se considera que estos cribados pre- y postpasteurización han determinado el rechazo de entorno a un 10-30% de la leche donada (Dewitte *et al.*, 2015; Simmer y Hartmann., 2009;). En este sentido, es importante tener establecido un sistema APPCC en los bancos de leche para controlar todas las etapas del procesamiento y así disminuir las pérdidas de leche donada (Cossey *et al.*, 2011).

**Tabla 12.** Criterios microbiológicos establecidos para el cribado de la leche antes de la pasteurización de acuerdo con las guías de bancos de leche de cinco países.

Francia (2008)	Reino Unido (2010)	EEUU y Canadá (2015)	Italia (2010)	Sudáfrica (2011)
<p>Cuando son mezclas de la misma donante:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Si los recuentos totales de microbiota aerobia son <math>&gt;10^6</math> ufc/mL: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Si: se descarta la mezcla</li> <li>- No: se mezclan y se analiza de nuevo la microbiota aerobia total y <i>S. aureus</i>:</li> </ul> </li> <li>• Si los recuentos totales <math>&gt;10^6</math> ufc/mL o <i>S. aureus</i> <math>&gt;10^4</math> ufc/mL: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Si: se descartan los lotes</li> <li>- No: se aceptan</li> </ul> </li> </ul> <p>Cuando se mezcla de distintas donantes, las mezclas se descartan si los recuentos totales de aerobios <math>&gt;10^5</math> ufc/mL o <i>S. aureus</i> <math>&gt;10^4</math> ufc/mL</p> <p>En todos los casos, la leche se guarda refrigerada mientras se esperan los resultados del análisis microbiológico.</p>	<p>Se analiza una muestra de cada mezcla de leche donada</p> <p>Se descarta la leche si se dan cualquiera de estas circunstancias:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Recuentos totales <math>&gt;10^5</math> ufc/mL</li> <li>• Enterobacterias <math>&gt;10^4</math> ufc/mL</li> <li>• <i>S. aureus</i> <math>&gt;10^4</math> ufc/mL</li> </ul>	<p>No se realizan</p>	<p>Se analiza la leche de la primera donación. También cuando la donante parece no tener medidas higiénicas adecuadas y de manera aleatoria cada cierto periodo de tiempo</p> <p>Se descarta la leche si se dan cualquiera de estas circunstancias:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Recuentos totales <math>&gt;10^5</math> ufc/mL</li> <li>• Enterobacterias <math>&gt;10^4</math> ufc/mL</li> <li>• <i>S. aureus</i> <math>&gt;10^4</math> ufc/mL</li> </ul>	<p>Para bancos de leche comunitarios, se emplea la acidez Dornic. Se descartan los lotes si tiene más de 8°D, al igual que en las guías brasileñas.</p>

Fuente: Picaud y Buffin (2017) y *Guidelines for the Establishment and Operation of a Donor Human Milk Bank* (HMBANA, 2015).

**Tabla 13.** Criterios microbiológicos establecidos para el cribado de la leche después de la pasteurización de acuerdo con las guías de bancos de leche de cinco países.

<b>Francia (2008)</b>	<b>Reino Unido (2010)</b>	<b>EEUU y Canadá (2015)</b>	<b>Italia (2010)</b>	<b>Sudáfrica (2011)</b>
Análisis rutinario.	Análisis regular.	Se analiza una muestra de cada mezcla de leche.	Análisis regular.	El análisis se realiza en una alícuota de leche de la primera donación de cada mujer.
Se analizan 0,5 mL de leche sin diluir en agar sangre y se incuban a 37°C durante 48 h:	<ul style="list-style-type: none"> <li>Al menos una vez al mes o cada 10 ciclos de pasteurización, dependiendo de que circunstancia tenga lugar primero.</li> <li>De manera específica si se instaura un nuevo proceso o equipo o se incorpora personal nuevo o si existen cualquier preocupación sobre alguna parte del proceso.</li> </ul>	El recipiente empleado de cada lote para recoger la alícuota será escogido al azar y descartado para su uso posterior.	Al menos una vez al mes o cada 10 ciclos de pasteurización o cualquier preocupación sobre el procedimiento.	Se siembran 100 µL de cada muestra en agar MacConkey y se incuban a 37°C durante 24 h.
<ul style="list-style-type: none"> <li>Cualquier mezcla con recuento positivo se descarta</li> <li>Se realiza un análisis documentado para encontrar las causas de contaminaciones recurrentes.</li> <li>La leche pasteurizada se mantiene en cuarentena en frío hasta que se reciben los resultados del análisis microbiológico.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>De manera específica si se instaura un nuevo proceso o equipo o se incorpora personal nuevo o si existen cualquier preocupación sobre alguna parte del proceso.</li> </ul> <p>Se descartará la leche que presente un recuento total igual o mayor a 10 ufc/mL.</p>	<p>Cualquier crecimiento bacteriano es inaceptable.</p> <p>La mezcla con recuentos positivos puede ser usada exclusivamente para investigación, o en su defecto, descartada.</p>	<p>Se descartará la leche que presente cualquier crecimiento bacteriano.</p> <p>La mezcla con recuentos positivos puede ser usada exclusivamente para investigación, o en su defecto, descartada.</p>	Si se encuentra cualquier contaminación, la leche será descartada y se volverá a hacer un análisis de la leche de la donante afectada en la siguiente donación.
Los recipientes de leche se pueden almacenar a +4°C durante un máximo de 48 h o congelados inmediatamente a -18°C.				

Fuente: Picaud y Buffin (2017) y *Guidelines for the Establishment and Operation of a Donor Human Milk Bank* (HIMBANA, 2015).



### III.4.2. Efecto en los componentes con actividad biológica

El efecto de la pasteurización Holder sobre los componentes con actividad biológica de la leche donada es de especial preocupación ya que muchos de los beneficios que se atribuyen a la leche materna dependen, en gran medida, de la presencia de estos compuestos.

De todos los componentes con actividad biológica presentes en la leche, las Igs han sido de los más estudiados por su importante papel en la prevención de infecciones y en el desarrollo saludable del RN. De manera global, tras la pasteurización Holder de la leche se han encontrado unos niveles de retención de IgA en torno al 20-60% (Braga y Palhares, 2007; Chang *et al.*, 2013; Contador, 2013; Czank *et al.*, 2009; Espinosa *et al.*, 2013; Evans *et al.*, 1978; Ford *et al.*, 1977; Goldsmith, 1983; Hamprecht *et al.*, 2004; Koenig *et al.*, 2005; Liebhaber *et al.*, 1977; Permanyer *et al.*, 2010; Sousa *et al.*, 2014). El número de estudios en el que se ha evaluado el efecto de la PHo en otras clases de Igs es mucho menor. Sin embargo, en todos ellos se ha encontrado una reducción tras el tratamiento térmico, tanto en muestras de calostro como de leche madura (Contador *et al.*, 2013; Espinosa *et al.*, 2013; Goldsmith *et al.*, 1983; Koenig *et al.*, 2005; Liebhaber *et al.*, 1977; Sousa *et al.*, 2014).

También se ha estudiado la repercusión de la pasteurización Holder en las citoquinas de la leche humana, por su importante papel regulador en la inflamación y, por ello, en la defensa frente a infecciones (Lonnerdal *et al.*, 2017). El efecto de la pasteurización en las citoquinas también se ha evaluado en muestras de calostro y de leche madura. En el primer caso, tras el tratamiento del calostro no se han observado cambios importantes para IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, el interferón (IFN)- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y MCP-1, pero sí un aumento de la IL7 y una disminución de MIP-1 $\beta$  (Espinosa *et al.*, 2013). De forma análoga, la concentración de IL-2, IL-4, IL-5, IL-12 e IL-13 en muestras de leche madura tampoco registró ningún cambio después del tratamiento, mientras que la de IL-10, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  disminuyó significativamente y, al contrario, la de IL-8 aumentó (Delgado *et al.*, 2014; Ewaschuk *et al.*, 2011).

En relación con los factores de crecimiento analizados, el factor de crecimiento transformante (TGF)  $\beta$ 2 es estable tras el tratamiento de muestras de calostro, al igual que el TGF  $\beta$ 1, el factor de crecimiento epidérmico y el factor de crecimiento de tipo epidérmico de unión a heparina (Espinosa *et al.*, 2013; Ewaschuk *et al.*, 2011; Goelz *et al.*, 2009; Untalan *et al.*, 2009). Por el contrario, el cambio registrado en el factor de crecimiento de hepatocitos y el factor de crecimiento insulínico tipo 1 y 2 tras la pasteurización fue variable, mientras que el G-CSF aumentó significativamente (Goelz *et al.*, 2009).

Por otra parte, y en relación a las hormonas presentes en la leche humana, después de la pasteurización se registra una disminución de los niveles tanto de

insulina como de adiponectina (Ley *et al.*, 2011), mientras que no hay diferencias en los de leptina (Chang *et al.*, 2013).

Otro de los componentes proteicos con actividad biológica en el que se ha estudiado el efecto de la pasteurización Holder es la lactoferrina. Se trata de una proteína con una actividad antimicrobiana interesante por su multifuncionalidad. No sólo tiene la capacidad de quelar hierro y reducir su disponibilidad para los patógenos que lo requieren para su crecimiento, inhibiendo su crecimiento, sino que también puede romper la membrana celular bacteriana al unirse al lípido A de los lipopolisacáridos (Ochoa y Cleary, 2009). Existe discrepancia sobre la destrucción de la lactoferrina después de la pasteurización de la leche humana, habiéndose registrado unos porcentajes de retención que oscilan en torno al 10-65%, según los distintos autores, aunque quizá dependa, al menos en parte, de las distintas técnicas empleadas (Chang *et al.*, 2013; Christen *et al.*, 2013; Czank *et al.*, 2009; Evans *et al.*, 1978; Ford *et al.*, 1977; Goldsmith *et al.*, 1983). Dado que los péptidos que se forman durante la digestión de la lactoferrina retienen la actividad bactericida, es posible que parte de la actividad antibacteriana de la lactoferrina se conserve en la leche humana pasteurizada, a pesar de que la concentración de esta proteína se reduzca.

La lisozima tiene una estructura muy estable mantenida por enlaces disulfuro y, por lo tanto, es altamente resistente al calentamiento. La mayoría de los estudios indican que la actividad de la lisozima se mantiene después de la pasteurización Holder, aunque el porcentaje de retención es bastante variable y oscila entre 15 y 80% (Chang *et al.*, 2013; Czank *et al.*, 2009; Evans *et al.*, 1978; Ford *et al.*, 1977; Hamprecht *et al.*, 2004; Mayayo *et al.*, 2016; Sousa *et al.*, 2014; Viazis *et al.*, 2007). Algunos autores han observado una disminución de la actividad de la lisozima con la pasteurización Holder (Gibbs *et al.*, 1977; Viazis *et al.*, 2007). Sin embargo, estos datos podrían cuestionarse puesto que derivan de ensayos en los que la actividad de la lisozima se determinó utilizando un ensayo turbidimétrico basado en la inhibición del crecimiento de *Micrococcus lysodeikticus* debida a la adición de muestras que contienen lisozima. Teniendo en cuenta que la leche materna es una mezcla compleja de varias enzimas y factores antibacterianos, no es posible discriminar si el efecto en el crecimiento de este microorganismo se debe solamente a una disminución en la concentración de lisozima y/o a la de otros factores presentes en la leche cruda.

### III.4.3. Efecto en la composición nutricional y bioquímica

Aunque la fracción proteica de la leche materna es muy variable entre madres y sufre cambios durante la lactancia, se estima que el contenido de proteínas de la leche a término, la más común en los bancos de leche, se encuentra entre 0,9 y 1,5 g/dL. Este valor suele ser mayor para la leche de madres que han tenido un hijo prematuro (Ballard y Morrow, 2013). El verdadero contenido de proteínas de la leche humana a menudo está sobreestimado, debido a la alta proporción de nitrógeno no-proteico presente en su

composición (Smilowitz *et al.*, 2014). Globalmente, en la mayor parte de los estudios publicados sobre el efecto de la pasteurización Holder en la concentración de las proteínas de la leche no se ha observado ningún cambio significativo, independientemente del método analítico empleado (García Lara *et al.*, 2013; Goes *et al.*, 2003; Hamprecht *et al.*, 2004; Ley *et al.*, 2011).

Pero, probablemente, tenga mayor interés evaluar el impacto de este tratamiento térmico en la composición de aminoácidos individuales de la leche que en la concentración total de proteína. En general, no se han detectado cambios importantes, excepto un ligero incremento en la cantidad de glutamina, arginina y leucina y una leve disminución del aspartato (Valentine *et al.*, 2010). Sin embargo, la relevancia biológica de estas variaciones es baja, ya que las diferencias son muy pequeñas.

Por otro lado, el contenido de lisina disponible es un marcador nutricional ya que los residuos de lisina son la “diana” de las proteasas durante la digestión. Pero los datos disponibles en relación con este parámetro son contradictorios, aunque las diferencias podrían estar relacionadas con el diseño experimental y el volumen de leche empleado para la pasteurización (Baro *et al.*, 2011; Silvestre *et al.*, 2006). Recientemente se ha señalado que el perfil de péptidos liberados después de someter a las proteínas de la leche a digestión gastrointestinal *in vitro* se conserva después de realizar el tratamiento térmico a la leche (Wada y Lönnerdal, 2015). Este dato confirma que la pasteurización Holder no afecta a la digestibilidad de las proteínas presentes en la leche materna.

En relación con los carbohidratos, ni la lactosa, ni los HMOs y glicosaminoglicanos, ni el *mio*-inositol parecen modificarse como consecuencia de la pasteurización (De Segura *et al.*, 2012; Espinosa *et al.*, 2013; García-Lara *et al.*, 2013; Vieira *et al.*, 2011). Es decir, no se producen cambios ni en el principal carbohidrato de la leche materna ni en el resto de las fracciones estudiadas que influyen positivamente en la salud del RN por su papel prebiótico, antiinfeccioso y antioxidante (Bertino *et al.*, 2008; Coscia *et al.*, 2015; Daniels, 2017). El efecto de la pasteurización Holder en la concentración de glucosa es muy variable, pero sin importancia biológica dada la baja concentración de este compuesto en la leche materna (De Segura *et al.*, 2012; Espinosa *et al.*, 2013; Ley *et al.*, 2011).

En general no se observan cambios en la fracción lipídica como consecuencia de la pasteurización Holder (Borgo *et al.*, 2015; Delgado *et al.*, 2014; Fidler *et al.*, 2001; Henderson *et al.*, 1998; Romeu-Nadal *et al.*, 2008; Valentine *et al.*, 2010). Puntualmente se ha descrito un ligero cambio en los AG de cadena media (Ewaschuck *et al.*, 2011) y una disminución del ácido  $\alpha$ -linolénico (Wardell *et al.*, 1981). Lamentablemente, la lipasa estimulada por las sales biliares, que se encuentra en la leche materna y que ayuda a la digestión y absorción de grasa en el intestino delgado

del niño, pierde por completo su actividad tras la pasteurización Holder (Baro *et al.*, 2011; Henderson *et al.*, 1998; Hernell y Bläckberg, 1994; Wardell *et al.*, 1984). Este es un cambio indeseable puesto que la grasa de la leche es la principal fuente de energía para el RN.

Aunque hay muy pocos datos disponibles sobre la concentración de vitaminas en leche materna, y sobre las ingestas recomendadas para las madres lactantes (Hampel *et al.*, 2014), la concentración de las vitaminas hidrosolubles (B<sub>12</sub>, riboflavina, biotina y ácido pantoténico) no se modifica tras este tratamiento térmico (Goldsmith *et al.*, 1983; Hamprecht *et al.*, 2004; Van Zoeren-Grobbe *et al.*, 1987). En cambio, si se ha encontrado una disminución significativa para las vitaminas B<sub>9</sub>, B<sub>6</sub> y C (MoltóPuigmartí *et al.*, 2011; Van Zoeren-Grobbe *et al.*, 1987). Dentro de las liposolubles, se ha observado una pérdida de las vitaminas D, A y E (Delgado *et al.*, 2014; Gomes *et al.*, 2016; MoltóPuigmartí *et al.*, 2011; Oliveira and Marinh, 2010; Ribeiro *et al.*, 2005; Romeu-Nadal M *et al.*, 2008).

Por otro lado, los niveles de hierro, cobre y zinc parecen reducirse ligeramente por la pasteurización Holder, pero la concentración final se encuentra dentro del rango aceptable requerido para cubrir las necesidades nutricionales específicas de los RN alimentados con leche pasteurizada (da Costa *et al.*, 2003).

Finalmente, la leche materna contiene una gran variedad de compuestos que pueden tener función antioxidante y son parte del sistema de defensa natural contra la acción de los radicales libres. El interés de esta fracción radica en que la capacidad antioxidante total de la leche materna parece jugar un papel muy importante en la protección celular frente al estrés oxidativo que suele asociarse con la NEC, la retinopatía de la prematuridad, la displasia broncopulmonar y otras complicaciones asociadas habitualmente a los prematuros (Friel *et al.*, 2002; Mehta y Petrova, 2014). Entre los distintos compuestos asociados a esta función pueden mencionarse el tocoferol, la cisteína, el glutatión, los carotenoides, la glutatión peroxidasa, la catalasa, la superóxido dismutasa, la lactoferrina, la coenzima Z y las vitaminas A, E y C, entre otros (Oveisi *et al.*, 2010). La diversidad de estos compuestos hace que en ocasiones se determine la capacidad antioxidante global de la leche para evaluar su estabilidad frente a la oxidación y la protección que va a ofrecer al RN. Aunque no existe mucha información, la pasteurización Holder parece no modificar ni la capacidad antioxidante total, ni ciertos compuestos antioxidantes específicos, como el glutatión y la glutatión peroxidasa, ni los principales marcadores de oxidación lipídica (el malonaldehído y el hexanal) (Elisia *et al.*, 2011; Silvestre *et al.*, 2008;).

### III.5. NUEVAS ALTERNATIVAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA LECHE DONADA

Como se ha indicado anteriormente, hasta la fecha, la pasteurización Holder se ha considerado el método más apropiado para conseguir la seguridad microbiológica de la leche donada. Sin embargo, tiene el inconveniente de que destruye parcial o completamente muchos de sus compuestos nutritivos y con valiosas actividades biológicas, tal como se ha descrito en el apartado anterior. Por ello, el Comité de Nutrición de la Asociación Europea de Gastroenterología Pediátrica, Hepatología y Nutrición (ESPGHAN, por sus siglas en inglés), en consonancia con un grupo de expertos en bancos de leche, ha puesto de manifiesto la importancia de potenciar la investigación en los bancos de leche para mejorar el procesamiento de la leche donada y, en particular, su tratamiento térmico (ESPGHAN Committee on Nutrition *et al.*, 2013).

En este sentido, recientemente se ha sugerido la conveniencia de emplear nuevas técnicas para el tratamiento de la leche donada en los bancos de leche. Entre las principales alternativas se encuentran la pasteurización a elevada temperatura durante un tiempo corto (conocida como pasteurización HTST, por sus siglas en inglés *High-Temperature Short-Time*, o pasteurización *flash*), el empleo de altas presiones hidrostáticas, la irradiación ultravioleta o la termoultrasonificación. De todas ellas, la pasteurización HTST, empleada por la industria láctea desde la década de 1930 (Holsinger *et al.*, 1997), es la técnica más estudiada hasta el momento con leche donada como alternativa a la pasteurización Holder.

#### III.5.1. Pasteurización HTST

Este método se basa en el mismo principio que la pasteurización Holder y tiene el mismo objetivo. Es decir, persigue destruir los microorganismos patógenos no esporulados presentes originalmente en la leche cruda. Pero este objetivo se consigue con el calentamiento a una temperatura superior, generalmente 72°C en el caso de la leche, y el mantenimiento a esta temperatura durante un tiempo sensiblemente más corto, 15 segundos. Aunque éstos son los parámetros estándar más empleados para el tratamiento de la leche donada, también se han estudiado otras combinaciones de temperatura (entre 62 y 82°C) y tiempo (de 1 a 19 segundos) (Dhar *et al.*, 1996; Goldblum *et al.*, 1984; Goldsmith *et al.*, 1983; Hamprecht *et al.*, 2004; Klotz, 2017; Terpstra *et al.*, 2007).

La primera vez que se puso en práctica la pasteurización HTST en leche humana se empleó un intercambiador de calor capilar de acero inoxidable a escala laboratorio (Goldsmith *et al.*, 1983). Con este sistema, se constató que en la leche así pasteurizada disminuía significativamente la concentración de Igs y lactoferrina. Un año después, utilizando un intercambiador de calor de placas industrial e inyectando la leche materna en una corriente de agua estéril, se comprobó que se destruían tanto el CMV inoculado

como las propias bacterias que contenía originalmente la leche cruda. Sin embargo, no se producían cambios significativos en el contenido de IgA e SIgA ni en el de la lactoferrina (Goldblum *et al.*, 1984).

Posteriormente, utilizando un dispositivo de flujo continuo a pequeña escala se comprobó que el tratamiento HTST destruía con eficacia *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* que habían sido inoculados en leche materna. En este caso, los niveles de IgM se reducían proporcionalmente a la temperatura y el tiempo de tratamiento empleados (Dhar *et al.*, 1996). También se intentó simular el calentamiento HTST mediante la rotación de un recipiente que estaba inmerso en un baño de agua caliente. El pequeño volumen (20 mL) de leche materna en relación con la capacidad del recipiente permitía distribuir la leche como una fina capa. De esta manera, se comprobó que calentar la leche a 72°C durante 5 segundos era suficiente para destruir la infectividad del CMV, aunque se producía una pérdida significativa del contenido de IgAs en comparación con la pasteurización Holder (Hamprecht *et al.*, 2004). Más recientemente, la pasteurización HTST en flujo continuo, realizada mediante la inyección de leche a través de un tubo de acero inoxidable ubicado en el interior de un baño térmico, ha mostrado ser efectiva también para la destrucción de virus envueltos en lípidos, como el VIH y los virus modelo para los virus de la hepatitis B y C, aunque se encontró un efecto muy limitado para los virus sin envuelta lipídica, como el de la hepatitis A (Terpstra *et al.*, 2007).

Otra forma de simular el calentamiento HTST es introducir volúmenes muy pequeños (~40 µL) de leche humana desnatada en capilares de vidrio y sumergirlos en un baño térmico a la temperatura de tratamiento. Con este abordaje, se comprobó la sensibilidad de la lactoferrina al calentamiento HTST, aunque la pérdida de actividad era menor que con la pasteurización Holder (Baro *et al.*, 2011; Goldsmith *et al.*, 1983; Mayayo *et al.*, 2014).

Los datos disponibles sobre el efecto del método HTST en la concentración y la actividad de la lisozima son completamente dispares. Algunos autores han indicado un aumento de la actividad, otros un descenso y otros, incluso, que se mantiene estable (Goldsmith *et al.*, 1983; Hamprecht *et al.*, 2004; Mayayo *et al.*, 2016). Cabe señalar que se utilizó un método diferente para realizar la pasteurización HTST en cada estudio, lo que posiblemente permita explicar estas diferencias.

Las actividades de importantes enzimas como la lipasa o la fosfatasa alcalina parecen destruirse por completo con el tratamiento HTST, al igual que ocurre con el método Holder (Dhar *et al.*, 1996; Goldblum *et al.*, 1984; Hamprecht *et al.*, 2004). Sin embargo, recientemente, se ha indicado que la pasteurización HTST en un equipo de sobremesa permite retener una mayor actividad de la lipasa estimulada por sales biliares que cuando se aplica el método Holder (Giribaldi *et al.*, 2016).

Aunque el contenido total de proteínas de la leche donada no se modifica al someter la leche a pasteurización HTST (Baro *et al.*, 2011; Hamprecht *et al.*, 2004; Silvestre *et al.*, 2006), dicho tratamiento parece afectar, en cierta medida, a la calidad de las proteínas, como se demuestra por una pérdida significativa de lisina (Silvestre *et al.*, 2006). Este resultado se ha puesto en duda empleando una metodología distinta y unas condiciones de tratamiento diferentes (Baro *et al.*, 2011). Otros nutrientes de la leche, como el ácido fólico y las vitaminas B<sub>12</sub> y C, no se alteraron significativamente en la leche pasteurizada con el método HTST (Goldblum *et al.*, 1984; Hamprecht *et al.*, 2004). En cambio, los niveles de glutatión reducido y de malondialdehído, así como la actividad de la glutatión peroxidasa y la capacidad antioxidante total son menores que en la leche cruda, pero la reducción registrada fue inferior a la de la leche pasteurizada por el método Holder (Silvestre *et al.*, 2008).

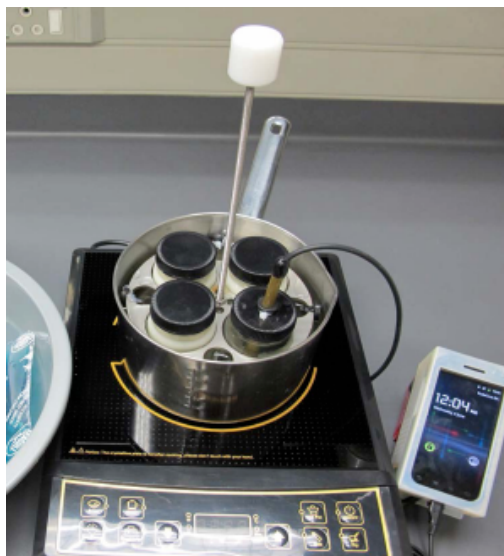
A pesar de las ventajas asociadas a este tipo de tratamiento, hasta la fecha no se ha desarrollado un dispositivo comercial validado que permita realizar la pasteurización HTST en las condiciones que se requieren en un banco de leche, a excepción de un prototipo de sobremesa patentado recientemente para pequeños volúmenes (Giribaldi *et al.*, 2016).

### **III.5.2. Pasteurización *flash heat***

La pasteurización por calentamiento rápido, conocida en entornos de recursos limitados como *flash heat*, es una técnica simple y de bajo coste propuesta por la Asociación de Bancos de Leche Humana de Sudáfrica para simular la pasteurización HTST aún sin disponer de equipos de alta tecnología (Chantry *et al.*, 2011). Este sencillo método consiste en verter la leche extraída por la madre (hasta 120 mL) en un frasco de vidrio limpio. Estos frascos se introducen en un recipiente de aluminio al que se le agrega agua fría suficiente para cubrir el volumen de leche y se coloca en el centro de una fuente de calor (Figura 15). Una vez que el agua empieza a hervir, los frascos con leche materna se sacan y dejan enfriar. Esta leche se puede almacenar durante 8 horas a temperatura ambiente (Chantry *et al.*, 2011).

Este calentamiento rápido inactiva el VIH-1 en leche materna (Israel-Ballard, 2005). Además, mantiene la actividad bacteriostática de la leche humana y solo provoca una disminución del 20% de los niveles de IgA, un 33% de IgG y un 38% de lactoferrina, valores en todos los casos por debajo de los encontrados tras la pasteurización Holder (Chantry *et al.*, 2009; Daniels *et al.*, 2017).

Ante la falta de disponibilidad de fármacos antirretrovirales, este tratamiento es ampliamente usado en varios hospitales sudafricanos para destruir el VIH de la leche de madres infectadas antes de alimentar a sus hijos. También se está usando para pasteurizar leche de donantes para niños vulnerables en la UCIN del Hospital King Edward (Coutsoudis *et al.*, 2011).



**Figura 15.** Pasteurización *flash heat* en el FoneAstra. Fuente: PATH

Para garantizar el control de calidad y la seguridad de esta tecnología, se diseñó un sistema de monitorización de temperatura de bajo coste denominado FoneAstra (Chaudhri *et al.*, 2011). Este sistema fue desarrollado por el Departamento de Ciencias de la Computación e Ingeniería de la Universidad de Washington en colaboración con *Program for Appropriate Technology in Health* (PATH) y la Asociación de Bancos de Leche de Sudáfrica (Figura 15). FoneAstra monitoriza la temperatura de la leche durante todo el proceso de calentamiento, aportando retroalimentación audiovisual continua para guiar al personal y generando informes en un servidor central. El sistema es adecuado para poblaciones de baja alfabetización, se puede usar en un teléfono Android y supone un coste en la región de aproximadamente 12.000 dólares, una pequeña parte de lo que puede costar un pasteurizadores comercial.

### III.5.3. Altas presiones hidrostáticas

El tratamiento por altas presiones hidrostáticas (o altas presiones) se considera una alternativa no térmica prometedora para la pasteurización de la leche donada. Este novedoso tratamiento de conservación se puede aplicar a alimentos sólidos y líquidos con el fin de obtener productos microbiológicamente seguros, nutricionalmente intactos y de alta calidad sensorial. La inactivación de los microorganismos se consigue mediante la aplicación de una alta presión hidrostática (400-800 MPa) durante un corto periodo de tiempo (menos de 5-10 minutos) a la leche envasada herméticamente en un envase flexible. Aunque se trata de un tratamiento no térmico, la presurización a temperatura ambiente suele ir acompañada de un aumento moderado de la temperatura (5-15°C), denominado calentamiento adiabático, que depende de la composición del alimento. Durante la descompresión se observa el fenómeno contrario, un enfriamiento,



siempre que no se pierda o se gane calor durante el tiempo de mantenimiento de la alta presión (Considine *et al.*, 2008).

La posibilidad de emplear esta tecnología como alternativa a la pasteurización Holder de la leche donada se ha evaluado en varias ocasiones. Tiene la ventaja de que se trata de un tratamiento isostático, y por ello muy uniforme independientemente del tamaño y la forma del alimento o envase que lo contiene, rápido y que no implica un excesivo aumento de la temperatura de la leche. Sin embargo, y de forma similar a lo indicado para la pasteurización HTST, se han evaluado una amplia gama de parámetros, en concreto, la presión (entre 200 y 900 MPa), el tiempo de tratamiento (entre 1 y 120 minutos) y temperaturas (entre 8 y 80°C). Dada la gran variabilidad de las condiciones estudiadas, es difícil comparar los resultados y establecer conclusiones generalizadas.

La diana primaria de la alta presión hidrostática en los microorganismos es la membrana celular, modificando notablemente su permeabilidad. Además, desnaturaliza algunas proteínas y provoca la desorganización de los ribosomas. Sin embargo, el efecto de las altas presiones hidrostáticas en los microorganismos es muy variable, de forma similar a lo observado tradicionalmente con las tecnologías térmicas. En general, la presión requerida para lograr la inactivación de bacterias Gram-positivas es mayor que para las Gram-negativas y los bacilos son más resistentes que los cocos, aunque la resistencia puede variar entre cepas de la misma especie y en función de las características del medio en el que se encuentren los microorganismos (Mussa y Ramaswamy, 1997).

La variabilidad de la inactivación de distintas especies bacterianas asociadas habitualmente con la leche materna se ha comprobado con muestras de leche donada previamente inoculadas y sometidas a un tratamiento de 400 MPa. La población de *Listeria monocytogenes* y *Streptococcus agalactiae* se redujo en 8 ciclos logarítmicos con un tratamiento de 2 y 4 minutos, respectivamente, mientras que *E. coli* y una cepa de *S. aureus* requirieron 30 min para lograr una reducción de 6 ciclos logarítmicos (Viazis *et al.*, 2008). La efectividad del procesamiento con altas presiones (400, 500 y 600 MPa durante 5 minutos a 12°C) para destruir la microbiota natural de la leche materna es comparable a la pasteurización Holder en condiciones ideales empleando muestras con una excelente calidad microbiológica inicial (Permanyer *et al.*, 2010). Sin embargo, estos tratamientos de altas presiones hidrostáticas, que son eficaces frente a las formas vegetativas, no destruyen de forma significativa las esporas; es más, parecen inducir la germinación de estas formas de resistencia. Para lograr la inactivación de las esporas es necesario emplear presiones mucho más elevadas y combinarlas con un tratamiento térmico suave para potenciar su acción, ya que se ha observado que ambos tratamientos tienen un efecto sinérgico.

En el caso de los virus, dado su alto nivel de diversidad estructural, el efecto de la presión también es variable (Smelt, 1998). La evidencia disponible hasta la fecha

sugiere que las altas presiones inactivan los virus al desnaturalizar las proteínas de la cápside, impidiendo la unión a su receptor en la superficie de la célula diana (Kingsley, 2013). La inactivación de distintos virus de interés en relación con la leche humana (virus de la hepatitis A, virus del herpes simplex, CMV, VIH) se logra con tratamientos que oscilan entre 300 y 600 MPa durante un corto periodo de tiempo (5-10 minutos) (Kingsley *et al.*, 2002; Landolfo *et al.*, 2003; Nakagami *et al.*, 1992; Nakagami *et al.*, 1996; Silva *et al.*, 1992). Aunque no es posible realizar una afirmación categórica, probablemente la mayoría de los virus que producen enfermedad en el hombre se eliminarían con los tratamientos que es necesario aplicar para destruir las bacterias patógenas no esporuladas. Sin embargo, los datos disponibles sobre el efecto de las altas presiones en virus presentes en muestras de leche materna es escaso.

La mayor parte de los estudios que han evaluado el tratamiento con altas presiones en leche humana han comprobado los cambios que se producen en los principales componentes inmunológicos. En general, a presiones bajas (400 MPa) no hay cambios sustanciales en los niveles de la IgA (Delgado *et al.*, 2013; Permanyer *et al.*, 2010; Viazis *et al.*, 2007). En cambio, la aplicación de tratamientos más intensos (500-600 MPa) tiene un efecto similar sobre el contenido de IgA, IgM e IgG que la pasteurización Holder, tanto en leche madura como en calostro (Contador *et al.*, 2013; Mayayo *et al.*, 2016; Sousa *et al.*, 2014). Por el contrario, la actividad de la lisozima no se altera como consecuencia del tratamiento con altas presiones en ninguna condición de las mencionadas, ni en el calostro ni en leche madura (Mayayo *et al.*, 2016; Sousa *et al.*, 2014; Viazis *et al.*, 2007).

En cuanto a la lactoferrina hay un aumento progresivo de su destrucción al hacerlo la presión empleada durante el tratamiento. Así, la aplicación de altas presiones a 300, 400, 500 y 600 MPa durante 15 minutos dio lugar a una retención de la lactoferrina del 91, 77, 66 y 52%, en comparación con el 20% retenido en la leche sometida a pasteurización Holder (Mayayo *et al.*, 2014). Además de una mayor retención, el tratamiento con altas presiones no provoca la agregación de la lactoferrina, a diferencia de lo que ocurre con las tecnologías térmicas.

La mayoría de las citoquinas se comporta de forma similar a la lactoferrina en relación con las altas presiones. El empleo de tratamientos moderados (300-600 MPa durante 1 minuto) apenas modifica su concentración, pero si se aplican condiciones más severas (900 MPa y 60-80°C) la disminución es significativa en algunas citoquinas (Delgado *et al.*, 2013). En general, cuando las condiciones de tratamiento son más suaves, el impacto en las citoquinas es bajo, especialmente en comparación con la pasteurización Holder (Delgado *et al.*, 2014).

Igualmente, en la leche sometida a 400-600 MPa la retención de vitamina C y E es mayor que en la leche pasteurizada con el método Holder, además de no observarse cambios en el perfil de AGs (Moltó-Puigmartí *et al.*, 2011). Sin embargo, cuando se

aplican condiciones más severas (300-900 MPa, 65-80°C, 1 min), el contenido de vitamina E se reduce significativamente (Delgado *et al.*, 2014). Y el tratamiento más extremo (900 MPa, 80°C) provoca cambios notables en el perfil de AGs (Delgado *et al.*, 2013).

El análisis de los compuestos volátiles aromáticos es útil para evaluar los cambios globales que ocurren durante y después del procesamiento, especialmente los derivados de reacciones adversas como la oxidación de lípidos. El perfil de compuestos volátiles en leche tratada con altas presiones es similar al de la leche humana cruda, aunque si aumenta la intensidad del tratamiento (600 MPa, 6 min) se potencia la formación de aldehídos, furanos y piranos indeseables. Estos compuestos se asocian con un aumento de la oxidación lipídica y la reacción de Maillard. En general, el efecto de las altas presiones sobre el perfil de volátiles fue menor que el causado por la pasteurización Holder (Contador *et al.*, 2015).

La leche pasteurizada con el método Holder tiene una mayor concentración de nucleótidos que la leche cruda. Este aumento se ha asociado a la hidrólisis de ácidos nucleicos y/o aductos de nucleótidos provocada por el calentamiento de la leche. En cambio, en la leche procesada con altas presiones no se observan estos cambios (Mateos-Vivas *et al.*, 2015).

En resumen, la evidencia disponible indica que cuando se aplica una presión  $\leq 400$  MPa a temperatura ambiente (o inferior) la retención de importantes componentes con actividad biológica (Igs, citoquinas, lisozima y algunas vitaminas) es mayor y el perfil de ácidos grasos mejor que cuando se aplica la pasteurización Holder. Sin embargo, es necesario estudiar con mayor profundidad la destrucción de bacterias y virus en leche materna sometida a este tratamiento y confirmar los datos experimentales obtenidos hasta el momento cuando el tratamiento se aplica dentro de un sistema diseñado para tratar los volúmenes reales de un banco de leche.

#### **III.5.4. Radiación ultravioleta (UV)**

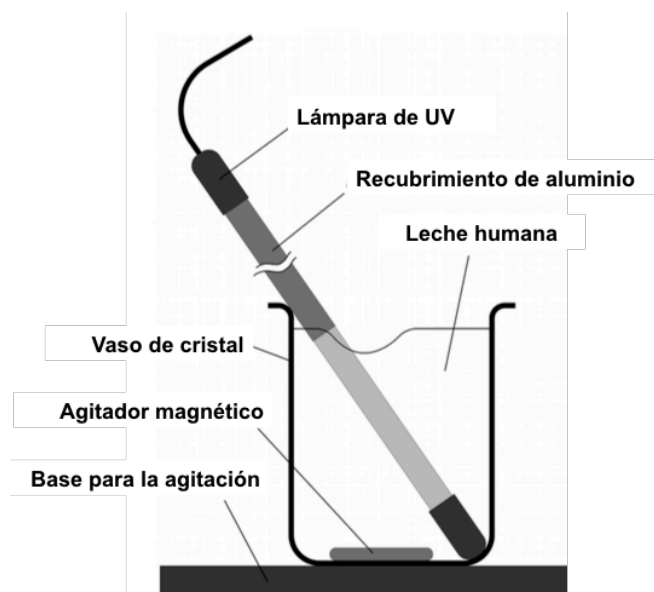
El procesamiento de la leche donada con radiación ultravioleta (UV) es otra alternativa posible a la pasteurización Holder. Del espectro que cubre la radiación UV, el rango de longitudes de onda que presenta mayor actividad antimicrobiana está entre 200 y 280 nm (radiación UV-C). El tratamiento con radiación UV se clasifica como un método de inactivación no térmica de microorganismos y su efectividad se ha demostrado frente a formas vegetativas de bacterias, esporas, levaduras, mohos, virus e, incluso, parásitos. El principal efecto letal de la radiación UV-C sobre los microorganismos es la formación de dímeros de timina, es decir, se establecen enlaces covalentes entre bases adyacentes y, en consecuencia, se inhibe la replicación del DNA. Este efecto se asocia con un rango de longitudes de onda más estrecho (250-270 nm) ya que la máxima absorbancia de energía del DNA se produce a 260 nm (Shama, 1999).

El principal inconveniente que tiene la radiación UV es su escasa capacidad de penetración, lo que limita su aplicación a agua y alimentos líquidos transparentes, así como para el tratamiento de superficies (equipos o envases). En este sentido, la leche materna es difícil de tratar con este tipo de tecnología, ya que se trata de un fluido opaco que presenta un coeficiente de absorción alto, que aumenta a medida que lo hace la concentración de sólidos totales de la leche, limitando así la profundidad de penetración de los fotones.

Hasta el momento, sólo un grupo de investigación ha evaluado el efecto de la radiación UV-C en relación con la microbiología de la leche donada. La instalación en la que se aplica este tratamiento consta de una lámpara UV-C (254 nm) dispuesta en un vaso de precipitados de vidrio donde se dispone la leche materna; para generar un flujo laminar de baja velocidad, la leche se agita durante el tratamiento (Figura 16) (Christen *et al.*, 2013). En primer lugar el efecto bactericida de la radiación UV-C se evaluó empleando muestras de leche humana que contenían diferentes concentraciones de sólidos solubles (ajustando el contenido de grasa) y que se inocularon con *S. epidermidis*, *Enterobacter cloacae*, *B. cereus* y *E. coli* K12. Se observó que existía una correlación entre la eficacia bactericida y la concentración total de sólidos de las muestras, así como con el aumento del tiempo de tratamiento. Estos resultados parecen indicar que, para asegurar una adecuada destrucción de las bacterias, este tratamiento debe ajustarse de acuerdo con los niveles de sólidos de la muestra (Christen *et al.*, 2013). Además, la radiación UV-C (254 nm) a una dosis de 64 mJ/cm<sup>2</sup> destruye la infectividad del CMV, previamente inoculado en la muestra de leche materna. Sería necesario comprobar dicha eficacia empleando las condiciones de trabajo habituales en los bancos de leche (Lloyd *et al.*, 2016).

Por otro lado, este tratamiento preserva la bioactividad de la lipasa y de la fosfatasa alcalina y no modifica el perfil de AGs de la leche materna, a excepción del ácido caprílico. En cambio, la retención de lactoferrina, lisozima e IgAs depende de las dosis de exposición (Christen *et al.*, 2013).

Es importante tener en cuenta que la luz UV-C induce reacciones químicas que dañan el DNA, como se ha indicado anteriormente, y favorecen la reticulación con proteínas (Rastogi *et al.*, 2010). Por ello, es necesario recabar la evidencia científica suficiente para evaluar la seguridad de la leche donada sometida a este tratamiento puesto que va dirigida a un grupo de RN muy vulnerables.



**Figura 16.** Instalación experimental para el tratamiento de leche materna con radiación UV-C. Fuente: Christen *et al.* (2013).

### III.5.4. Termo-ultrasonicación

Los ultrasonidos de elevada frecuencia ( $>1$  MHz) y potencia ( $<1$  W/cm<sup>2</sup>) se han aplicado durante mucho tiempo en la industria alimentaria como una herramienta no invasiva de análisis, de forma similar a las aplicaciones para el diagnóstico en Medicina. En los últimos años se ha explorado la utilización de ultrasonidos de menor frecuencia ( $\sim 40$  kHz) y mayor potencia ( $>5$  W/cm<sup>2</sup>) para la conservación de alimentos líquidos. El efecto conservador de los ultrasonidos se debe al fenómeno de cavitación producido por la propagación de las ondas en el seno de los líquidos. La rapidísima formación y colapso de las burbujas de cavitación libera una gran cantidad de energía localmente que destruye a los microorganismos, sin tener un impacto importante en los nutrientes y en la calidad general de los alimentos (Chemat *et al.*, 2011). La sonicación por sí sola no es eficaz para destruir las bacterias presentes en los alimentos y se ha combinado con un calentamiento suave, lo que se conoce como termo-ultrasonicación (Sango *et al.*, 2014). Mientras que este tratamiento no afecta a las caseínas, las proteínas del suero se desnaturalizan y este efecto se acentúa cuando los ultrasonidos se combinan con calor. Una de las posibles ventajas asociadas a este método de conservación sería la homogenización de la grasa de la leche por la ruptura de los glóbulos de grasa de la leche (Czank *et al.*, 2010).

Este método de tratamiento podría tener interés para la conservación de la leche materna porque se ha comprobado su eficacia bactericida (en leche contaminada artificialmente con *E. coli* y *S. epidermidis*) cuando se combina con un calentamiento a 50°C durante 2-8 minutos. Además, en estas condiciones se retiene el 91% de la SIgA,

el 80% de la lisozima, el 77% de la lactoferrina y el 45% de la lipasa estimulada por sales biliares (Christen *et al.*, 2012; Czank *et al.*, 2010). Sin embargo, no hay datos sobre el efecto de la termo-ultrasonicación en cuanto a la destrucción de virus y otras bacterias presentes en la leche materna, ni se ha desarrollado ningún sistema para llevar a cabo este tratamiento en un banco de leche.



**IV. VALIDACIÓN DEL CUESTIONARIO DE UN BANCO  
DE LECHE PARA DETERMINAR LA PRESENCIA  
DE DROGAS ILEGALES, NICOTINA Y CAFÉINA**

---

VALIDATION OF A SCREENING QUESTIONNAIRE FOR A  
HUMAN MILK BANK TO DETERMINE THE PRESENCE  
OF ILLEGAL DRUGS, NICOTINE AND CAFFEINE

*Publicado en "The Journal of Pediatrics"*





## Validation of a Screening Questionnaire for a Human Milk Bank to Determine the Presence of Illegal Drugs, Nicotine, and Caffeine

Diana Escuder-Vieco, BSc<sup>1,2</sup>, Óscar García-Algar, PhD<sup>2,3</sup>, Simona Pichini, PhD<sup>4</sup>, Roberta Pacifici, PhD<sup>4</sup>,  
Nadia Raquel García-Lara, MD<sup>1,2</sup>, and Carmen Rosa Pallás-Alonso, PhD<sup>1,2</sup>

**Objectives** To validate the health and lifestyle questionnaire answered by donors to a human milk bank with respect to the presence of illegal drugs, nicotine, and caffeine levels in donor milk.

**Study design** A total of 400 human milk samples from 63 donors were analyzed by liquid chromatography tandem mass spectrometry for the presence of 14 illegal drugs, nicotine, and caffeine. Demographics and clinical and lifestyle data (illegal drugs, tobacco, and caffeinated beverage use) were collected from the required screening questionnaire of a human milk bank. The relationship between the 2 evaluation techniques was determined.

**Results** Illegal drugs were not found in donor milk. Nicotine (46.1 ng/mL) and cotinine (138.6 ng/mL) were quantified in one milk sample from a donor who did not report tobacco use in the questionnaire (1.6% false negative). Caffeine was detected in 45.3% (181/400) of the total milk samples, with a mean concentration of  $496 \pm 778$  ng/mL. The sensitivity and specificity of the questionnaire to detect caffeine in donor milk was 46% and 77%, respectively.

**Conclusions** The lifestyle questionnaire is reliable for the assessment of illicit drug use by donors to a human milk bank, but there are certain limitations regarding the identification of second-hand smoke exposure and the disclosure of consumption of caffeinated beverages. Data such as smoking habits of partners, type and volume of beverage or food containing caffeine, method of preparation, and time of day of consumption should be collected by the questionnaire. (*J Pediatr* 2014;164:811-4).

Mother's own milk is the ideal choice for feeding infants during at least the first 6 months of life because of the health benefits it confers. When mother's milk is not available or is insufficient, milk from a human donor is recommended.<sup>1</sup> The selection of healthy and reliable donors is one of the most important aspects of human milk banks. Internationally, these centers have monitored the risk of transmission of infectious agents through donor milk by developing screening questionnaires, blood tests and, as an additional security measure, pasteurization of donor milk (62.5°C for 30 minutes) to kill viruses and potential pathogenic bacteria.<sup>2,3</sup>

There is less emphasis placed on determining the presence or absence of legal or illegal drugs in this biologic fluid. The only information available is provided by the donors themselves in the self-report required by the screening questionnaire that must be completed before the women are accepted as donors.

Psychoactive drugs and caffeine taken by the mother during breastfeeding are known to be secreted into breast milk.<sup>4</sup> The American Academy of Pediatrics recommends against breastfeeding in mothers with positive illegal drug screening and suggests avoiding the consumption of tobacco and alcohol.<sup>1</sup> By contrast, some experts believe that a maternal limit of 300 mg daily of caffeine might be a safe level of intake.<sup>5</sup> Risk assessment based on the subject's self-report by a questionnaire is widely used. However, there is no validation of the questionnaire. The objective of the present study was to validate the health and lifestyle questionnaire answered by donors with respect to the presence of illegal drugs, nicotine, and caffeine in the donor milk.

### Methods

This study was approved by the local Ethics Committee, with informed consent from all participants. The study was conducted at Human Milk Bank, Neonatology Unit, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain, between February and July 2009.

Each donor who wished to participate in the study was provided with several glass containers for expressing human milk along with labels for her name and the expression date of the milk. A different container was used for each new expression. All containers were kept frozen in the donor's home and transported to the milk bank without the transporter breaking the cold chain. Subsequently,

From the <sup>1</sup>Department of Neonatology, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain; <sup>2</sup>SAMID Network (Spanish Collaborative Maternal and Child Health Research Network); <sup>3</sup>URIE, Hospital del Mar, Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM), Parc de Salut Mar, Barcelona, Spain; and <sup>4</sup>Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy

Funded by Spanish Health Research (FIS 09/00040). The authors declare no conflicts of interest.

Portions of this study were presented as a poster at the International Society For Research in Human Milk and Lactation Conference, "Breastfeeding and the Use of Human Milk: Science and Practice," Trieste, Italy, September 27, 2012.

LC-MS/MS Liquid chromatography tandem mass spectrometry

0022-3476/\$ - see front matter. Copyright © 2014 Mosby Inc. All rights reserved. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2013.11.043>

to perform an adequate pasteurization, different containers of milk from the same donor were mixed into a pool (maximum 1 L). From each of these pools, an aliquot of 1.5 mL of human milk was stored frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until it was analyzed for illegal drugs, nicotine, and caffeine. The aliquots were collected in the chronological order in which they arrived at the milk bank. Consequently, each sample used in the study spans an average time period of 1 month from the beginning of the donation period. In total, 400 human milk samples were collected for analysis of illegal drugs, nicotine, and caffeine from 400 different pools.

### Health Questionnaire

A health and lifestyle questionnaire was completed by each donor participant on the first visit to the milk bank before any of her expressed milk was accepted. The following data were collected from the enrolled donors: demographic data (maternal age and birthplace), clinical data (gestational age, parity, medications or vitamin supplements) and lifestyle data (number of coffee, tea, and soft drinks per day; active smoker; illegal drug user).

Expression dates gathered from the labels of each milk container and data from the questionnaire permit classification of samples according to type: colostrum (milk from less than 7 days after delivery), intermediate milk (7–21 days after delivery), and mature milk (more than 21 days after delivery). The study included 63 donors who fulfilled the requirements of the Human Milk Bank. The exclusion criteria for rejecting a mother as donor included the use of illicit drugs, being an active smoker, and daily consumption of more than 2 caffeinated beverages per day (coffee, tea, or soft drinks).

### Biochemical Analyses

A validated, reversed-phase liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) test<sup>6</sup> was used to determine the concentration of illegal drugs, nicotine, and caffeine. The analysis was performed with an Alliance High Performance Liquid Chromatography system (Waters, Etten-Leur, The Netherlands) interfaced to a Micromass Quattro micro API triple quadrupole mass spectrometer (Waters Corporation, Milford, Massachusetts) equipped with an electrospray ion source.

Analytes were extracted from the human milk buffered at pH 5.5 with solid-phase extraction for substance recovery ranging from 71.1% to 86.5%. The intra- and interassay imprecision (measured as coefficient of variation) and inaccuracies (measured as % error) were always lower than 20%. The analytes and limits of detection in breast milk were as follows: 3 ng/mL for caffeine; 3 ng/mL for nicotine; 2 ng/mL for cotinine; 1.5 ng/mL for morphine; 1 ng/mL for 6-acetylmorphine and codeine; 2 ng/mL for amphetamine; 2.5 ng/mL for 3,4-methylenedioxy-methamphetamine; 1 ng/mL for methamphetamine; 1 ng/mL for benzoylecgonine and cocaine; 2 ng/mL for cocaethylene; 1 ng/mL for 1-nor-9-carboxy- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol; 1.5 ng/mL for 11-hydroxy- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol and  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol; 2 ng/

mL for methadone; and 2.5 ng/mL for 2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine. Alcohol was not analyzed.

Human milk testing has a detection window with a typical range from a few hours to 1 day after a single intake of substances such as nicotine, cotinine, caffeine, cocaine, heroin, and morphine. Others, such as cannabis or amphetamines, can be detected up to a few days or months later.<sup>4</sup>

### Statistical Analyses

Biochemical data were tested for normality of distribution by a Kolmogorov-Smirnov test. Caffeine concentration was expressed as the mean and 95% CI of the mean. The average number of samples per donor was expressed as the median and IQR because they were not normally distributed.

Agreement or disagreement between self-report use and LC-MS/MS results was determined by kappa coefficients.<sup>7,8</sup> Sensitivity and specificity values are reported with 95% CIs for illegal drugs, nicotine, and caffeine. The effect of collection date on caffeine concentration was determined by the Fisher test. Donors who delivered human milk samples for at least 2 months were included in this analysis. Caffeine levels were categorized into 4 classes: low (0 ng/mL), medium (1–165 ng/mL), high (166–625 ng/mL), and very high levels (>625 ng/mL). Differences were considered significant at  $P < .05$ . Statgraphics Centurion XVI version 16.1.15 (Statpoint Technologies Inc, Warrenton, Virginia) was used to perform these analyses.

## Results

The Human Milk Bank accepted milk from 64 donor mothers. Of these 64, 63 accepted to participate in the study with a mean age of  $35.7 \pm 4.75$  years (range, 23–53). Among these donor mothers, 50 had a term delivery (after 37 weeks of gestation), and 39 were primigravida. A total of 85.7% (54/63) of the mothers were from Spain, 12.7% (8/63) were from Central and South America, and 1.6% (1/63) was from another European country. Of these donors, 52 gave samples of mature milk, 4 gave both intermediate and mature milk, 2 donors gave colostrum and intermediate milk, 4 donors gave only colostrums, and 1 donor gave colostrum, intermediate and mature milk.

The average number of samples per donor was  $4 \pm 13.4$  (IQR, 2–6). In total, 400 milk specimens were used in the study: 16 colostrum, 19 intermediate milk, and 365 mature milk.

No illegal drugs were found, consistent with the answers given by the donors on the questionnaire because none reported taking these substances. Thus, the false-negative rates of the questionnaire for illicit drugs were 0% and the specificity of the questionnaire to detect illegal drugs was 100%.

Nicotine and its metabolite cotinine were found in one mature human milk sample. Nicotine levels were 46.1 ng/mL, and cotinine levels were 138.6 ng/mL. This positive sample belonged to a donor who had provided another 102 samples for the study which tested negative for legal and illegal drugs. No donor said she was an active smoker on the questionnaire (exclusion criteria).



Finally, caffeine was found in 45.3% (181/400) of the total donor milk samples, with a mean concentration of  $496 \pm 778$  ng/mL (95% CI, 382-609; range, 0-7564). These positive samples were 56.2% (9/16) colostrum; 52.6% (10/19) intermediate milk, and 44.4% (162/365) mature milk.

The relation between self-reported caffeinated beverage use on the questionnaire and the analysis of caffeine in donor milk by LC-MS/MS is shown in the Table. The probability of expected agreement between self-reports of caffeinated beverage use and detection of caffeine in donor milk was 0.45 and the kappa value was 0.22. The sensitivity and specificity of the questionnaire to detect caffeine in donor milk was 46.7% (95% CI 31.9-62) and 77.8% (95% CI 51.9-92.6) respectively. On the basis of the type of milk analyzed, for colostrum the sensitivity was 20% (95% CI 1.1-70.1) and the specificity was 50% (95% CI 2.7-97.3); for intermediate milk, the sensitivity was 40% (95% CI 7.3-83) and the specificity was 0% and, finally, in the case of mature milk, the sensitivity was 48.7% (95% CI 32.7-65) and the specificity 66.7% (95% CI 41.2-85.6). The consumption of caffeinated beverages (coffee, tea, or soft drinks) from mothers who reported having drunk these beverages (25/63) was  $1.46 \pm 0.52$  drinks/day. No donor reported having taken any prescription or over-the-counter medication containing caffeine.

A total of 22 donors delivered human milk samples for at least 2 months. In only one of these donors was there a relationship between collection time and caffeine levels in milk ( $P = .030$ ), the caffeine levels being greater as donation time increased. A total of 60% (19/32) of all the samples expressed before completing the questionnaire contained caffeine vs the 44% (162/368) expressed later on ( $P = .09$ ).

## Discussion

Our main result was the good agreement between self-report and milk analysis for illegal drug use. A single milk sample with nicotine and cotinine was from a mother who stated she was a nonsmoker (1.6% false-negative result on the questionnaire). The sensitivity and specificity of the questionnaire to detect caffeine in donor milk was 46% and 77%, respectively. The sensitivity and specificity of the questionnaire to detect caffeine in mature milk was greater than for colostrum and intermediate milk. The absence of illegal drugs in milk donors is likely attributable to the fact that the population is highly sensitive to the benefits of breastfeeding.

**Table.** Self-reported caffeinated beverage use and presence of caffeine in donor milk

Reported use of caffeinated beverages	Donor milk test (gold standard)		Total
	Positive	Negative*	
Yes	21	4	25
No	24	14	38
Total	45	18	63

\*Below the detection limit of the method (3 ng/mL).

The concentration of caffeine is similar to that found in previous studies in which caffeine in breast milk from caffeine-consuming mothers was between 32 and 4000 ng/mL,<sup>9-15</sup> except for one with a level of 7564.26 ng/mL. These caffeine levels, as for nicotine, may vary depending on the time between drinking the last caffeinated beverage and the time of the milk expression (data not collected in our questionnaire). The mean elimination half-life of caffeine in breast milk usually occurs about 5-6 hours after having the drink.<sup>15-17</sup> It is possible that 16% (4/25) of the participants who reported having drunk caffeinated beverages and who tested negative in their donor milk samples, had coffee, tea, or soft drinks at times distant from the collection of the milk.

By contrast, 63.2% (24/38) donors who reported nonuse of caffeinated beverages during donation had caffeine in their milk.

This finding could be attributable first to the provision of false information by the donors (improbable because caffeine is not considered a drug of abuse) or second because of a faulty design in our questionnaire regarding the gathering of information on possible sources of caffeine. The questionnaire asked for the number of coffees, teas, soft drinks, and medications consumed per day. However, there are certain foods and beverages containing caffeine that were not considered, such as energy drinks, chocolate found in candy, deserts, and beverages like chocolate milk, along with food that uses chocolate or coffee as an ingredient, such as yogurt, ice cream, and baked goods. To improve data collection on caffeine consumption, a more complete record of the type of drink or food should be specified. Second, the approximate volume or grams of each drink or food consumed should be recorded. Third, the usual time of day (morning, afternoon, evening, or night) when the donor consumes these products should be reported and finally, the donor should report the usual time of day when she expresses her milk for the milk bank.

On the basis of the concentrations found in the milk, including the highest, the potential exposure of an infant to caffeine ingested through breast milk is not of concern. The recommended loading dose for caffeine citrate for apnea of prematurity is 20 mg/kg, followed by a 5-10 mg/kg/d maintenance dosage.<sup>18</sup> Moreover, unlike theophylline, caffeine is associated with lower rates of toxicity.<sup>19</sup>

Since its opening, the Human Milk Bank of the Hospital 12 de Octubre, has rejected only 13 of its 568 donors. The main reasons for the exclusion have been: receiving blood transfusions, positive serology for hepatitis B or C, a metabolic disease (3-methylcrotonylglycinuria), a strictly vegan diet, and being an active smoker. No mothers have been rejected as donors because of an addiction to illicit drugs.

This study has certain limitations. First, the short half-life of some drugs in breast milk means that we could not guarantee that a donor had not consumed certain toxic substances before the time of milk expression for the bank. Second, the donor knew that the study would check for illicit or harmful elements in her milk and was aware that the testing would not be anonymous, although confidential.

In conclusion, the results of the present study suggest that the self-report questionnaire of a human milk bank is reliable for ruling out possible use of illicit drugs and tobacco by the donors. However, there is a poor agreement between caffeine in the milk and the self-reported consumption of caffeinated beverages. It is possible that these results would improve if a differently designed questionnaire included information about the type and volume of beverage or food containing caffeine, method of preparation, and time of day of consumption. ■

*The generosity of the human milk donors made this research possible. We also thank Dr Emilia Marchei and Donatella Mattioli (Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy) for technical assistance, Spanish Collaborative Maternal and Child Health Research Network Spanish Collaborative Research Network, and Ann Marie Strigari for her editing assistance.*

Submitted for publication Feb 16, 2013; last revision received Oct 29, 2013; accepted Nov 19, 2013.

Reprint requests: Diana Escuder-Vieco, BSc, Department of Neonatology, Hospital 12 de Octubre, Edificio Materno-Infantil, Avda de Córdoba s/n, 28041 Madrid, Spain. E-mail: diana.e.vieco@gmail.com

## References

1. American Academy of Pediatrics. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics* 2012;129:827-41.
2. de Segura AG, Escuder D, Montilla A, Bustos G, Pallás C, Fernández L, et al. Heating-induced bacteriological and biochemical modifications in human donor milk alter Holder pasteurization. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012;54:197-203.
3. Hamprecht K, Maschmann J, Müller D, Dietz K, Besenthal I, Goelz R, et al. Cytomegalovirus (CMV) inactivation in breast milk: reassessment of pasteurization and freeze-thawing. *Pediatr Res* 2004;56:529-35.
4. Fríguls B, Joya X, García-Algar O, Pallás CR, Vall O, Pichini S. A comprehensive review of assay methods to determine drugs in breast milk and the safety of breastfeeding when taking drugs. *Anal Bioanal Chem* 2010;397:1157-79.
5. Santos IS, Matijasevich A, Domingues MR. Maternal caffeine consumption and infant nighttime waking: prospective cohort study. *Pediatrics* 2012;129:860-8.
6. Marchei E, Escuder D, Pallas CR, García-Algar O, Gómez A, Fríguls B, et al. Simultaneous analysis of frequently used licit and illicit psychoactive drugs in breast milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 2011;55:309-16.
7. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977;33:159-74.
8. Viera AJ, Garrett JM. Understanding interobserver agreement: the kappa statistic. *Farm Med* 2005;37:360-3.
9. Pellegrini M, Marchei E, Rossi S, Vagnarelli F, Durgbanshi A, García-Algar O, et al. Liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry assay for determination of nicotine and metabolites, caffeine and arecoline in breast milk. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2007;21:2693-703.
10. Blanchard J, Weber CW, Shearer LE. HPLC analysis of methylxanthines in human breast milk. *J Chromatogr Sci* 1990;28:640-2.
11. Tyralla EE, Dodson WE. Caffeine secretion into breast milk. *Arch Dis Child* 1979;54:787-800.
12. Ryu JE. Effect of maternal caffeine consumption on heart rate and sleep time of breast-fed infants. *Dev Pharmacol Ther* 1985;8:355-63.
13. Ryu JE. Caffeine in human milk and in serum of breast-fed infants. *Dev Pharmacol Ther* 1985;8:329-37.
14. Bailey DN, Weibert RT, Naylor AJ, Shaw RF. A study of salicylate and caffeine excretion in the breast milk of two nursing mothers. *J Anal Toxicol* 1982;6:64-8.
15. Oo CY, Burgio DE, Kuhn RC, Desai N, McNamara PJ. Pharmacokinetics of caffeine and its demethylated metabolites in lactation: predictions of milk to serum concentration ratios. *Pharm Res* 1995;12:313-6.
16. Berlin CM Jr, Denson HM, Daniel CH, Ward RM. Disposition of dietary caffeine in milk, saliva, and plasma of lactating women. *Pediatrics* 1984;73:59-63.
17. Stavchansky S, Combs A, Sagraves R, Delgado M, Joshi A. Pharmacokinetics of caffeine in breast milk and plasma after single oral administration of caffeine to lactating mothers. *Biopharm Drug Dispos* 1988;9:285-99.
18. Charles BG. Caffeine citrate treatment for extremely premature infants with apnea: population pharmacokinetics, absolute bioavailability, and implications for therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit* 2008;30:709-16.
19. Henderson-Smart DJ, Steer PA. Caffeine versus theophylline for apnea in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2010;1-19.

**V.**

**DETERMINACIÓN DE LA ACIDEZ EN LA LECHE  
DONADA: COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS  
OBTENIDOS POR DOS TÉCNICAS ANALÍTICAS**

---

**DETERMINATION OF ACIDITY IN DONOR MILK:  
COMPARISON OF RESULTS OBTAINED BY  
2 DIFFERENT ANALYTICAL METHODS**

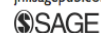
***Publicado en "The Journal of Human Lactation"***



## Original Research: Brief Report



Journal of Human Lactation  
1–3  
© The Author(s) 2015  
Reprints and permissions:  
sagepub.com/journalsPermissions.nav  
DOI: 10.1177/0890334415591338  
jhl.sagepub.com



# Determination of Acidity in Donor Milk: Comparison of Results Obtained by 2 Different Analytical Methods

Diana Escuder-Vieco, BSc<sup>1,2</sup>, Sara Vázquez-Román, MD<sup>1</sup>, Juan Sánchez-Pallás, BSc<sup>3</sup>, Noelia Ureta-Velasco, MD<sup>1</sup>, Rocío Mosqueda-Peña, MD<sup>1</sup>, and Carmen Rosa Pallás-Alonso, PhD<sup>1,2</sup>

## Abstract

**Background:** There is no uniformity among milk banks on milk acceptance criteria. The acidity obtained by the Dornic titration technique is a widely used quality control in donor milk. However, there are no comparative data with other acidity-measuring techniques, such as the pH meter.

**Objective:** The objective of this study was to assess the correlation between the Dornic technique and the pH measure to determine the pH cutoff corresponding to the Dornic degree limit value used as a reference for donor milk quality control.

**Methods:** Fifty-two human milk samples were obtained from 48 donors. Acidity was measured using the Dornic method and pH meter in triplicate. Statistical data analysis to estimate significant correlations between variables was carried out. The Dornic acidity value that led to rejecting donor milk was  $\geq 8$  Dornic degrees ( $^{\circ}\text{D}$ ).

**Results:** In the evaluated sample size, Dornic acidity measure and pH values showed a statistically significant negative correlation ( $\tau = -0.780$ ;  $P = .000$ ). A pH value of 6.57 corresponds to  $8^{\circ}\text{D}$  and of 7.12 to  $4^{\circ}\text{D}$ .

**Conclusion:** Donor milk with a pH over 6.57 may be accepted for subsequent processing in the milk bank. Moreover, the pH measurement seems to be more useful due to certain advantages over the Dornic method, such as objectivity, accuracy, standardization, the lack of chemical reagents required, and the fact that it does not destroy the milk sample.

## Keywords

breastfeeding, donor milk, human milk banking, quality control, acidity

## Well Established

*It is essential to achieve quality control of donor human milk. The determination of acidity by the Dornic method is the traditional quality control used in milk banks to assess the nutritional and technological conditions.*

## Newly Expressed

*This study determined the pH cutoff corresponding to the Dornic degree limit used as a reference for donor milk quality control. The calculation was performed using a mathematical expression that linearly correlates the results obtained from both testing methods.*

## Background

Donor human milk is recommended as the first alternative when maternal milk is not available, especially for sick or premature infants, due to the vast potential benefits that it provides compared with breast milk substitute.<sup>1</sup>

To date, there are no worldwide uniform guidelines for the screening, processing, storage, and handling of donor

milk among milk banks. Because of this, the current techniques to check donor milk are under constant review.

The determination of acidity is one of the common controls performed on milk donated to milk banks.<sup>2</sup> The overall acidity of breast milk comprises natural acidity (provided by casein, minerals, and organic acids) and developed acidity (due to lactic acid and other organic acids from the microbial degradation of lactose and, occasionally, from the lipids from milks in decline). The acidification of breast milk has been shown to cause a decrease in white blood cells, lipase

<sup>1</sup>Department of Neonatology, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

<sup>2</sup>SAMID Network (Spanish Collaborative Maternal and Child Health Research Network), RD12/0026/0007, Spain

<sup>3</sup>Environmental Science Degree, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

Date submitted: September 22, 2014; Date accepted: May 21, 2015.

### Corresponding Author:

Diana Escuder-Vieco, BSc, Department of Neonatology, Hospital 12 de Octubre, Edificio Materno-Infantil, Avda de Córdoba s/n, 28041 Madrid, Spain.

Email: diana.e.vieco@gmail.com



activity, and total protein.<sup>3</sup> Lipoprotein lipase is not stable at pH below 5, and bile salt-stimulated lipase has a neutral to alkaline pH optimum value (pH 7.3-8.6).<sup>4,5</sup> On the other hand, it is likely that in an acidic environment, the casein fraction of the milk will denature and precipitate, resulting in an unstable milk to heat treatment.<sup>6</sup> Holder pasteurization (62.5°C, 30 minutes) is the most widely used method to achieve the microbiological safety of donor milk.<sup>1</sup> Thus, measuring the acidity of donor milk is an indicator not only of nutritional quality but also of technological quality.

Currently, milk banks determine acidity by the Dornic method, accepting that the donor milk is suitable for heat treatment when acidity is 8° Dornic degrees (°D) or less.<sup>7</sup> However, direct measurement of pH using a pH meter also provides information on total acidity, but there are no data concerning the correlation between pH measurement and Dornic acidity.

The aim of this study is to assess the correlation between the Dornic titration method and the pH measurement with calibrated electrodes to determine the pH cutoff corresponding to the Dornic degree limit value used as a reference for donor milk quality control.

## Methods

### Samples

Donor samples ( $n = 52$ ) were obtained from 48 donors who fulfilled the requirements of the Human Milk Bank (negative serology for breast milk transmission of viral disease and a healthy lifestyle). Some donors provided more than one sample for this study, taken at different times. Before taking the sample, donors had to wash their hands and sterilize their breast pump or the breast pump borrowed from the milk bank. The samples were collected in sterile glass containers provided by the bank, which were kept chilled at  $-18^{\circ}\text{C}$  to  $-20^{\circ}\text{C}$  until brought into the milk bank by the donors themselves, without breaking the cold chain. Subsequently, the samples were thawed at  $37^{\circ}\text{C}$  in a shaking water bath (LabCompanion, Seoul, Korea) and divided into aliquots to analyze acidity. This study was reviewed and approved by the institutional review board of the Hospital 12 de Octubre de Madrid, and informed consent was obtained from each donor.

### Analytical Methods

**Titrateable acidity expressed in Dornic degrees (°D).** One drop of 1% (w/v) phenolphthalein in 95% (v/v) ethanol (turning point at pH 8.2-8.4) was added to each 1-mL sample of human milk. The mixture was titrated with N/9 NaOH (Dornic solution) until the first color change (to pink) persisted for 30 seconds. Each 0.01 mL of Dornic solution expended to neutralize 1 mL of human milk was equivalent to 1°D. Milk with  $\geq 8^{\circ}\text{D}$  was rejected and milk with  $\leq 4^{\circ}\text{D}$  was considered of excellent quality.

**pH measurement.** The pH human milk samples ( $20\text{--}25^{\circ}\text{C}$ ) were measured with a calibrated pH meter (pH-Meter BASIC 20; Crison, Barcelona, Spain) equipped with a glass electrode (5011T; Crisol, Barcelona, Spain). The sensitivity value of this technique is 0.01.

Each sample was analyzed in triplicate using both methods.

### Statistical Analysis

Prior to analysis, the sample size was estimated with PASS 13 software (NCSS, Kaysville, Utah, USA). Thus, assuming nonnormal distribution of data, a sample size of 27 was expected to be sufficient when a 2-sided 95% confidence interval with a width equal to 0.2 and an estimated Kendall  $\tau$  correlation of 0.800 were considered. The Shapiro-Wilk test was used to assess normality of data distribution. The Kendall  $\tau$  correlation coefficient was used to test the correlation for the measured variables, using the statistical package R 2.15.3 (R Core Team, Vienna, Austria).

## Results

The relevant donor data and the samples analyzed in this study were as follows: median gestational age of the infants at birth was 39 weeks (interquartile range [IQR], 38-40.5), the median time period from delivery to the expression date of the donor samples was 129 days (IQR, 69-258), and the median freezing period was 15 days (IQR, 10-24). Of the 52 samples analyzed, 94% (49/52) were under the limits recommended for consumption (acidity  $\leq 8^{\circ}\text{D}$ ); of these, 83% (41/49) of the samples were of top quality (acidity  $\leq 4^{\circ}\text{D}$ ). Furthermore, median Dornic acidity was 3 (IQR, 2-4), and median pH was 7.23 (IQR, 7-7.34).

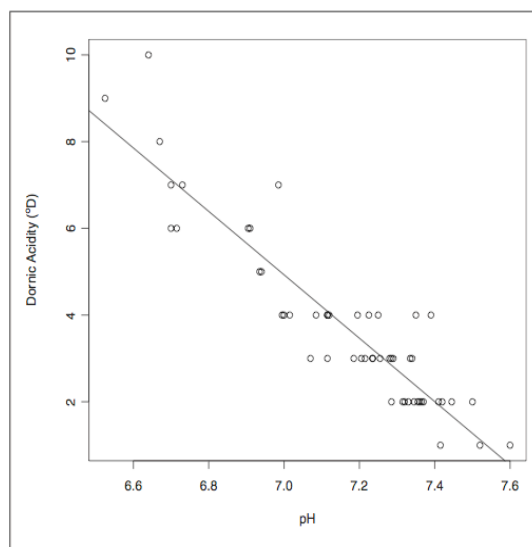
The correlation between both acidity-measuring methods was obtained by the Kendall  $\tau$  correlation coefficient calculation; thus, a high significant inverse correlation was observed ( $\tau = -0.780$ ,  $P < .000$ ). Figure 1 shows the graphical representation of the linear model obtained. In addition, the expression of the model was acidity =  $56.170 - 7.321 \times \text{pH}$ . A pH of 6.57 corresponds to an acidity of  $8^{\circ}\text{D}$ , and a pH of 7.12 corresponds to top quality milk (acidity of  $4^{\circ}\text{D}$ ).

## Discussion

The aim of this study was to determine the pH cutoff corresponding to the Dornic degree limit value used as a reference for donor milk quality control.

Donor milk with  $8^{\circ}\text{D}$  acidity had a pH of 6.57, a limit below which it is not ideal to pasteurize donor milk. Moreover, a pH of 7.12 indicates an acidity value of  $4^{\circ}\text{D}$ . As a result, donor milk with a pH of 7.12 or above could be considered top quality.

To establish these cutoffs, the correlation between the traditionally used Dornic titration method vs the measuring of

**Figure 1.** Linear Correlation Analysis of Dornic Acidity and pH.

Dornic acidity degrees in donor milk were negative correlated with pH values ( $r = -0.780$ ,  $P = .000$ )

pH with calibrated electrode devices was assessed. A high coefficient of correlation value was obtained between Dornic degrees and pH units in the total donor milk samples analyzed. This finding was expected because both techniques measure the overall acidity in the milk. Moreover, the pH values obtained in this study are similar to those found by other authors who analyzed breast milk samples that had been collected and stored under controlled conditions.<sup>8-11</sup>

Although the Dornic method is the traditional test to check the quality of donor milk, this technique has some disadvantages because it is an indirect and subjective method (the detection of the turning point varies depending on the training of the clinical staff), has low sensitivity, requires the use of chemical reagents, and destroys the samples. On the other hand, the determination of pH with calibrated electrode devices is standardized and objective, with high sensitivity and accuracy. Furthermore, it does not require the use of chemical reagents and does not destroy the milk sample during the analysis, allowing the sample to be reused if necessary. All of these characteristics highlight that the use of pH meters might be a more convenient alternative than Dornic titration to determine the overall acidity of milk.

One of the most significant limitations of this study is the fact that the correlation has been established with a limited number of milk samples. These samples have low acidity values as a result of the careful sampling and transportation process performed by donors to hinder sample deterioration.

## Conclusion

The results of this study revealed that donor milk with a pH over 6.57 may be accepted for subsequent processing in a milk bank. In addition, measuring acidity using a pH meter offers certain advantages over the traditional Dornic degree method.

## Declaration of Conflicting Interests

The authors declare no potential conflicts of interest with respect to this research, authorship, and/or publication of this article.

## Funding

The authors disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This study was funded by Spanish Health Research Funding (grant FIS 09/00040).

## References

1. ESPGHAN Committee on Nutrition, Arslanoglu S, Corpeleijn W, Moro G, et al. Donor human milk for preterm infants: current evidence and research directions. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2013;57(4):535-542.
2. Vázquez-Román S, García-Lara NR, Escuder-Vieco D, et al. Determination of Dornic acidity as a method to select donor milk in a milk bank. *Breastfeed Med.* 2013;8(1):99-104.
3. Erickson T, Gill G, Chan GM. The effects of acidification on human milk's cellular and nutritional content. *J Perinatol.* 2013;33(5):371-373.
4. Olivecrona T, Hernell O. Human milk lipases and their possible role in fat digestion. *Pediatr Padol.* 1976;11(4):600-604.
5. Freed LM, York CM, Hamosh P, et al. Bile salt-stimulated lipase of human milk: characteristics of the enzyme in the milk of mothers of premature and full-term infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1987;6(4):598-604.
6. McMahon DJ, Du H, McManus WR, et al. Microstructural changes in casein supramolecules during acidification of skim milk. *J Dairy Sci.* 2009;92(12):5854-5867.
7. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Banco de leite humano: funcionamento, prevenção e controle de riscos.* Brasília, Brazil: Anvisa; 2008.
8. Hamosh M, Ellis LA, Pollock DR, et al. Breastfeeding and the working mother: effect of time and temperature of short-term storage on proteolysis, lipolysis, and bacterial growth in milk. *Pediatrics.* 1996;97(4):492-498.
9. Morris FH Jr, Brewer ED, Spedale SB, et al. Relationship of human milk pH during course of lactation to concentrations of citrate and fatty acids. *Pediatrics.* 1986;78(3):458-464.
10. Slutzah M, Codipilly CN, Potak D, et al. Refrigerator storage of expressed human milk in the neonatal intensive care unit. *J Pediatr.* 2010;156(1):26-28.
11. Miranda M, Gormaz M, Romero FJ, et al. Stability of the antioxidant capacity and pH of human milk refrigerated for 72 hours: longitudinal study. *Nutr Hosp.* 2011;26(4):722-728.



## **VI.**

### **DISEÑO Y VALIDACIÓN DE UN SISTEMA HTST PARA LA PASTEURIZACIÓN DE LECHE DONADA EN UN BANCO DE LECHE HUMANA**

---

### **DESIGN AND VALIDATION OF A HTST SYSTEM FOR PASTEURIZATION OF DONOR MILK IN A HUMAN MILK BANK SETTING**

*Manuscrito en preparación*



## VI. 1. INTRODUCTION

Human milk provides the nutrients that best fit the needs of the growing infant. In addition, its content in specific bioactive compounds also protects against infections and modulate maturation of the digestive and immune systems and neurodevelopment. Furthermore, breast milk composition is highly variable and adaptable to the specific needs of the particular infant in order to promote both survival and healthy development (Ballard and Morrow, 2013). Therefore, mother's own breast milk is the gold standard for the feeding and nutrition of term and preterm newborn during the first months of life.

When a mother's own milk is unavailable, or is in short supply to meet the nutritional requirements of the preterm infants, a common occurrence in Neonatal Intensive Care Units (NICU), the next best alternative is the use of donor human milk (DHM) (AAP, 2012; DiLauro *et al.*, 2016; ESPGHAN *et al.*, 2013). The use of DHM is associated to a reduction in the incidence of necrotizing enterocolitis, protection against late-onset sepsis and improved feeding tolerance compared to formula milk in this high-risk group of infants (Quigley and McGuire, 2014; Sisk *et al.*, 2016). Human Milk Banks (HMB) are established to recruit and screen milk donors, collect, treat (including bacteriological screening, pasteurization, and storage) and distribute the donated milk. In order to provide safe DHM, implementation of stringent quality control and quality assurance process are required in HMB (DeMarchis *et al.*, 2016).

The microbiological quality of DHM is one of the main concerns in most HMB as it will be administered mainly to preterm or sick infants, who are especially susceptible to infections. Numerous studies have shown that human milk contains a site-specific microbiota, mainly composed of staphylococci, estreptococci and corynebacteria, that plays an important role in the initiation and development of the neonatal gut microbiota and contribute to the maturation of the immune system (Fernández *et al.*, 2013; Jeurink *et al.*, 2013). Furthermore, the manipulation involved in DHM extraction and management may be a source of microbial contamination of DHM. The presence of some members of the family *Enterobacteriaceae* and other Gram-negative bacteria in human milk is frequently associated to the use of pumps for milk extraction (Landers and Updegrave, 2010). Pumps and other utensils may be a source of bacteria for DHM because drinkable water contains microorganisms and regular cleaning protocols applied to them do not ensure their destruction (Marín *et al.*, 2009). The nutrient rich composition of DHM may foster the growth of microorganisms that have gain access by any circumstance to DHM, despite having naturally some antibacterial factors (Isaacs, 2005). Occasionally, mother's milk has been a vehicle for pathogenic microorganisms derived from the mother or the NICU environment, such as *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp., *Serratia* sp., *Staphylococcus* or human cytomegalovirus, causing late onset sepsis, especially in preterm and very low birth weight infants (Godambe *et al.*, 2005; Gras-Le *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2016).

To ensure microbiological safety, the milk is pasteurized in most HMB in order to kill all non-spore forming pathogenic microorganisms (Landers and Updegrave, 2010). At present, a low temperature long time (LTLT, heating at 62.5°C for 30 minutes) pasteurization, also known as “Holder” pasteurization is the heat treatment most commonly applied to DHM. High-risk viruses such as human immunodeficiency virus, cytomegalovirus, papillomaviruses, T-lymphotrophic virus, as well as Ebola virus, Marburg virus, and Zika virus, are also destroyed after Holder pasteurization of human milk (Chiavarini *et al.*, 2011; Donalisio *et al.*, 2014; Hamilton Spence *et al.*, 2017; Orloff *et al.*, 1993; Pfaender *et al.*, 2017; Rigourd *et al.*, 2011). However, spore-forming bacteria, such as *Bacillus* sp., may survive this heating process (de Segura *et al.*, 2012). LTLH pasteurization fulfills the microbiological safety standards but, on the other hand, some nutritional and biological components, such as immunoglobulins, hormones or enzymes, result negatively affected, at a higher or lower degree of degradation (Peila *et al.*, 2016). Another disadvantage associated with the Holder pasteurization in the commercial units available is that the production is limited to the size of the devices.

Recently, the high-temperature short-time (HTST) pasteurization, a well-established heat treatment in dairy industry, has been proposed for the treatment of DHM (Peila *et al.*, 2017; Picaud and Buffin, 2016). This method involves heating milk rapidly to 72°C, keeping it for a few seconds (usually 15 s), and cooling it down immediately. HTST is, at least, equivalent to Holder pasteurization in terms of ensuring milk microbiological safety (Goelz *et al.*, 2009; Terpstra *et al.*, 2007) while is better at preserving the functionality of its biologically active components (Baro *et al.*, 2011; Giribaldi *et al.*, 2016; Goelz *et al.*, 2009; Silvestre *et al.*, 2008). Different experimental systems, such as laboratory capillary heat exchangers, small water baths or industrial heat exchangers, have been used for HTST pasteurization of DHM, but they have never been tested in HMB conditions, with the only exception of a benchtop pasteurizer for small volumes described recently (Dhar *et al.*, 1996; Giribaldi *et al.*, 2016; Goldblum *et al.*, 1984). Most HMB around the world are located within or close to local hospitals NICU's, and often they do not provide enough DHM to meet all the existing demand, sometimes not even to feed the most vulnerable preterm infant's at the NICUs (DeMarchis *et al.*, 2016). Centralization of DHM processing and distribution would expand notably the access to DHM and, in consequence, the benefits of DHM consumption, improving significantly infant health outcomes.

In this context, the objective of this work was to design a continuous HTST system to pasteurize DHM in the HMB operating environment. After the set-up of this equipment, we aimed to evaluate the effect of DHM pasteurization performed in this equipment at different temperatures and holding times on the microbiota of DHM. Alkaline phosphatase (ALP) and  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase (GGTP) activities were analyzed in order to check their usefulness as heating indicators. Finally, the potential nutritional damage of HTST treatment of DHM was evaluated using the furosine ( $\epsilon$ -N-2-furoylmethyl-L-lysine) and lactulose (4-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl-D-fructose)

indices, as indicators of the Maillard reaction, one of the main undesirable consequences of heat treatment.





## VI. 2. MATERIALS AND METHODS

### VI. 2.1. Human milk samples

Donor human milk (DHM) samples were obtained from the HMB located at the Hospital 12 de Octubre in Madrid (Spain). Milk collection was performed following a specific protocol for donor mothers approved by the local ethics committee and informed consent was obtained from each donor. Milk was collected at home using either electric (Lactaline; Ameda, Lincolnshire, Illinois, USA) or manual (Harmony or Lactaset models; Medela, Baar, Switzerland) pumps, frozen (-18°C) in a domestic refrigerator, and transported to the human milk bank in an insulated box with ice packs.

The milk samples, that were stored frozen (-20°C) until processing at the human milk bank facilities, were thawed in a shaking water bath (Jeio Tech BS-21; Lab Companion, Seoul, Korea) at 37°C. Milk from multiple donors (~12 donors) was pooled to a volume of ~10 L in a vertical laminar-flow cabinet (Fortuna 1200 Maxi; Controltecnica Instrumentación Científica SL, Madrid, Spain) composing a production batch. The pH value of each batch was measured before processing using a pH-meter model Basic 20 (Crison Instruments SA, Barcelona, Spain). Only batches having pH values equal or higher than 6.5 were further processed (Escuder-Vieco *et al.*, 2016). Two aliquots (111 mL for microbiological and chemical analysis and 120 mL for Holder pasteurization) from each production batch were separated before HTST treatment, whereas the rest of the pool was processed as described below. All aliquots of untreated (raw) or processed DHM were store frozen (-20°C) until analysis.

### VI. 2.2. Design of an HTST equipment for DHM processing

An HTST equipment was designed in collaboration with SIVE Fluid Systems (Alcalá de Henares, Madrid, Spain), a company specializing in fluid food processing. The equipment should meet the demand of DHM after the official creation of the Regional Human Milk Bank “Aladina-MGU” of the Comunidad de Madrid (Spain) that serves DHM to hundreds of preterm and sick infants admitted in all public hospitals with neonatal units in the Madrid area (population of ~6.5 million). Therefore, the HTST equipment should ideally have accurate and simple operation as well as process and product flexibility, as the available amount of DHM for processing will be variable. In addition, the processing time and labor force, and therefore the costs, should be reduced significantly. The final goal would be to provide efficiently high quality safe DHM.

Measurement of the refractive index to follow the concentration of total soluble solids (°Brix) of the fluid leaving the heating section was measured using a manual refractometer (RHB 32 ATC; Lumen Optical Instrument Co., Ltd., Fuzhou City, China).

### VI. 2.3. Holder pasteurization of DHM

A 120 mL aliquot of DHM from each production batch was placed onto a sterile glass container and pasteurized using the Holder method by heating it at 62.5°C for 30 min in a shaking (30 rpm) water bath (Jeio Tech BS-21, Lab Companion, Oxfordshire, UK) provided with temperature control. After pasteurization, the containers were transferred immediately into another shaking water bath (Jeio Tech BS-21) filled with ice-cold water for fast cooling. Once the target temperature (4°C) was reached, that was always within the first 15 minutes of cooling, the milk was stored at -20°C until analysis. A wireless temperature data logger thermometer (Mesa Labs, Inc., Lakewood, Colorado, USA) was introduced in a control bottle (cow's milk) to be used as a probe to monitor the temperature of the milk batch by using the DataTrace Pro software (Mesa Labs). The water bath maintained the required temperature with a precision of  $\pm 0.2^\circ\text{C}$ .

### VI. 2.4. Bacterial cultures and identification of isolates

Proper peptone water dilutions of raw and heat-processed (by either Holder or HTST methods) DHM samples were spread onto Brain Heart Infusion (BHI, Oxoid, Basingstoke, UK; a general-purpose medium suitable for the cultivation of nonfastidious bacteria, yeasts, and moulds), Columbia nalidixic acid agar (CNA, BioMérieux, Marcy l'Etoile, France; a highly nutritious, general-purpose medium for the isolation and cultivation of fastidious microorganisms, in particular Gram-positive bacteria from clinical samples such as *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* and *Corynebacterium*), Kanamycin Aesculin Azide (KAA, Oxoid; a selective medium for the isolation of *Enterococcus*), Polymyxin-pyruvate-egg yolk mannitol with bromothymol blue (PEMBA, Oxoid, a selective medium for the isolation of *Bacillus*), and MacConkey (MCK, BioMérieux; a selective medium for the isolation of enterobacteria) agar media. Samples of hot water (100  $\mu\text{L}$ ) obtained immediately before starting the heat treatment of DHM were also plated onto the media listed above. Plates were aerobically incubated at 37°C for 24 to 48 h.

After bacterial counting, at least one bacterial colony showing a characteristic morphology (colour, size, shape, halos) of each of the types present on every plate was isolated. All isolates were grown in BHI broth and stored at -80°C after the addition of glycerol (30%, v/v). Identification of the isolates was performed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) using the Vitek-MS™ system (BioMérieux) at the facilities of ProbiSearch (Tres Cantos, Madrid, Spain). For this purpose, a small portion of a bacterial colony (about 1  $\mu\text{L}$ ) was spotted directly onto a MALDI sample plate, and overlaid with a matrix containing a saturated solution of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid in 28% (v/v) acetonitrile. After drying, and crystallization of the matrix and the sample, a laser beam ionizes the sample generating single protonated ions from peptides on the sample. These protonated ions are separated based on their mass-to-charge ratio ( $m/z$ ).

The detection and measurement of the time required for these ions to travel the length of the flight tube allows constructing a spectrum or peptide mass fingerprint. For each isolate a mean spectrum (built with at least 50  $m/z$  spectra profiles) was compared to those contained in the Myla database (BioMérieux). The isolates were identified at the species level when there was a 99 to 100% match to the species-specific  $m/z$  values in the database.

### VI. 2.5. Random amplification of polymorphic DNA and pulsed-field gel electrophoresis

Genetic relatedness among selected enterococci isolated from unheated and heat-processed DHM was investigated by Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD). RAPD profiles were obtained using primer OPL5 (5'-ACGCAGGCAC-3') that was originally designed for lactobacilli but it has been shown to be useful also for typing other bacterial groups (Veyrat *et al.*, 1999). Isolates showing the same RAPD profile were subjected to Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) in a CHEF DR II apparatus (Bio-Rad, Birmingham, UK) using the protocol described by Jiménez *et al.* (2008) with the following modifications. To separate *Sma*I fragments of DNA a pulse time was applied from 2 to 28 s for 24 h and then another from 15 to 60 s for 13 h, for the latter. Computer-assisted analysis was performed with InfoQuest FP software (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, USA). Cluster analysis of RAPD and PFGE pattern profiles was performed using the UPGMA method based on the Dice correlation similarity coefficient.

### VI. 2.6. Enzymatic assays

ALP activity was analyzed using the enzymatic Alkaline Phosphatase Diethanolamine Detection Kit (Sigma-Aldrich) adapted for the 96-well plate format. This assay uses *p*-nitrophenyl phosphate (pNPP) as the substrate. The enzymatic hydrolysis of pNPP to *p*-nitrophenol (pNP) and inorganic phosphate at 37°C was followed for 2 h by monitoring the increase in absorbance at 405 nm (pNP) at pH 9.8 using a microplate spectrophotometer (Zenyth 200RT, Anthos Labtec Instruments GmbH, Salzburg, Austria). Samples of untreated and heat-processed DHM (stored at -20°C) were thawed on ice and diluted with distilled water (1:5, v/v) before assayed as described by the manufacturer. The activity of ALP was expressed as nmoles of pNP released per mL of DHM and per minute under the assay conditions.

$\gamma$ -Glutamyl transpeptidase (GGTP) activity was assayed spectrophotometrically using  $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide (Sigma) and glycylglycine (Sigma) as substrates as described by McKellar *et al.* (1991) in a 96-well plate format. In this assay, GGTP catalyzes the synthesis of the tripeptide  $\gamma$ -glutamylglycylglycine and the release of *p*-nitroaniline at 37°C for 20 min. The GGTP activity was determined after a diazo coupling reaction with the released *p*-nitroaniline by monitoring the increase in absorbance at 540 nm using a microplate spectrophotometer (Zenyth 200RT). Samples

of untreated and heat-processed DHM were treated as described above for the ALP assay, except that Holder pasteurized milk samples were diluted to 1:20 and the rest of samples to 1:50 concentration. The activity of GGTP was expressed as  $\mu\text{mol}$  of *p*NA released per mL of DHM and per minute under the assay conditions.

### **VI. 2.7. Determination of furosine and lactulose**

Furosine analysis in raw and heat-treated DHM samples was carried out by ion-pair reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) following the method of Resmini *et al.* (1990), although it was adapted to smaller volumes (1 mL) as described by Espinosa-Martos *et al.* (2013). Protein concentrations were determined by the bicinchoninic acid (BCA) assay using the BCA Protein Assay Reagent (Thermo Fisher Scientific Inc, Rockford, IL) and bovine serum albumin as standard. All analyses were done in duplicate, and the values were expressed as milligrams of furosine per 100 g of protein.

Lactulose concentration in raw and heat-treated DHM samples was determined by gas chromatography with flame ionisation detector, following the method described by Montilla *et al.* (2005) with the modifications described by Espinosa-Martos *et al.* (2013). The identity of lactulose present in the samples was confirmed by comparison with relative retention times of standard samples. Quantitative analysis was carried out by the internal standard method. Response factors were calculated after triplicate analysis of lactulose standards (1 to 50 mg/L). The limit of detection and the limit of quantification of the gas chromatography method for lactulose were 4 and 10 mg/L, respectively.

### **VI. 2.8. Statistical analysis**

Microbial counts were recorded as colony-forming units (cfu)/mL and were transformed to  $\log_{10}$  values before statistical analysis. Results are displayed as means  $\pm$  standard deviation (SD) or as means and 95% confidence interval (CI) of the mean. For comparisons, data were analyzed using one-way ANOVA and Tukey multiple comparison *post hoc* tests or paired Student's *t*-tests. Significance was set at  $p < 0.05$ .

## VI. 3. RESULTS

### VI. 3.1. Design of the HTST system

A small-scale continuous flow HTST system was designed and constructed to process DHM at the facilities of the HMB located at the Hospital 12 de Octubre (P201531186; PCT\_ES2016\_070594) (Figures 1A and 1B). The system consists of the following major units: holding tanks and pumps, heat exchange and holding sections, and temperature and flow controllers and a recording device. All parts of the equipment that come in contact with DHM were made of AISI Type 316 stainless steel.

The open stirred feed vessel (20 L) that provides a constant supply of milk was equipped with an impeller driven by a DC motor, used at low speed (90-95 rpm), to mix the pooled DHM and avoid phase separation during the process. A tuning fork switch controls the volume of milk present in this vessel (which also allows the recirculation of fluid, if required). A peristaltic pump conveys the fluid (DHM or water) from the feed vessel to the heat exchangers under pressure at a flow rate of 10 L/h. The flow rate of the solution can be changed by adjusting the rotor disc speed and is measured by an electromagnetic flow meter.

The core of the HTST system includes three sections: heating, holding and cooling. The heating and cooling sections are corrugated mono-tube heat exchangers that are installed in series and arranged into two separate sections. The first section comprises two heat exchangers to preheat DHM with hot water to the desired processing temperature (70 to 75°C). The last section is made up of other three heat exchangers to quickly cool down the heat-treated DHM to 2 - 4°C with chilled water. The monotube configuration of the heat exchangers determines that the milk flows through the inner tube while the hot or cold water flows in a counter-current arrangement through the annular space between the inner and the outer tube. The holding tube, that ensures the proper time of treatment at the specified temperature, is located between the heating and the cooling sections. Four temperature transmitters measure the fluid temperature before entering and after leaving the heating section, after leaving the holding tube, and after leaving the cooling section. A pressure transmitter monitors continuously the pressure of pasteurized milk at the exit point. Two independent secondary circuits provide hot and cold water for the process.

A closed isothermal tank (25 L) with an impeller driven by a DC motor and used at low speed (90-95 rpm) holds the pasteurized milk before packaging. This tank allows separating milk packaging from heat processing and is located in a laminar flow safety cabinet provided with a filter (0.22 µm) to prevent microorganisms and particles entering the deposit. The tank has a manual valve for dispensing the required volume of pasteurized DHM in sterile containers, according to the demand of the HMB.

The equipment has a control unit composed of a touch screen display to adjust all operating parameters and procedures and a recorder to gather the records of all parameters (such as milk flow rate, position locks of the security valves, temperature of the fluid at several points of the process, and temperature of the hot water circuit). All acquired data were downloaded and analyzed with dedicated software in order to assess the adequacy of the process.

### **VI. 3.2. Operation of the HTST system**

Prior to each trial, the equipment was sanitized using circulating hot water (85°C) for at least 5 minutes for proper thermal sanitizing (Figure 2). Next, the temperature of processing (for both the heating and cooling sections) was equilibrated at a water flow rate of 10 L/h to reach the operating conditions. Then, the batch of thawed DHM was poured into the feed vessel and mixed for ~5 min. Milk processing started after checking the pH of the production batch. The first part of the flowing liquid consisting in a mixture of water and DHM that leaves both the heating section (through the return to the feed vessel relief valve; ~200 mL) and the cooling section (through the aseptic closed tank; ~200 mL) was discarded until the refractive index of the fluid was ~9.5 °Brix.

DHM leaving the heating section recirculated (by-pass valve) to the feed vessel until: a) a temperature hysteresis of less than 0.5°C was registered between the temperature recorded by temperature transmitters located before and after leaving the holding tube and the fixed set point of pasteurization; and, b) the difference in temperature registered by temperature transmitters located before and after leaving the holding tube was greater than 2°C (for at least 15 s). Otherwise, properly heated DHM flowed to the cooling section, and samples of properly heat-treated cold DHM were taken from the exit of the aseptic tank using sterile containers.

A typical profile of temperatures and fluid flow during the operation of the HTST unit is shown in Figure 2. Over the course of this study, a series of trials were carried out in which the treatment temperature (70 to 75°C) and holding time (5 to 25 s) were varied to evaluate their effects on microbial survival in DHM after heat processing. All the holding times (5 to 25 s) for a specified temperature (70, 72 or 75°C) were carried out using a single 10-liter batch of DHM, with the most stringent processing conditions (longer holding time) applied first. In order to obtain DHM samples that had been heated at a fixed temperature but with different residence time at the holding section, the flow rate of the DHM was modified according to data presented in Table 1. The diameter (9.40 mm) and length (3.83 m) of the conduction (from the exit of the holding tube to the point of final sampling) were taken into account to calculate the adequate sampling time (lag time for sampling plus a safety factor of an additional 30%). More detailed representative graphs showing the temperature and flow rate evolution during trials carried out at 70, 72 and 75°C are shown in Figure 3.

Parallel, a sample of DHM from each production batch was submitted to Holder pasteurization using the facilities of the human milk bank of the Hospital 12 de Octubre. The residence time-temperature profiles of the Holder pasteurization that had been registered in the control bottle corresponding to 14 batches of DHM are shown in Figure 4. In accordance with the guidelines for DHM pasteurization set out by the HMB, milk temperature rapidly increased to 62.5°C (in ~20 min), was maintained stable (between 62.5 and 64°C) for 30 min, and then decreased to 4°C in less than 20 min, for all the batches processed.

The HTST system incorporates a Cleaning-In-Place (CIP) system. The cleaning procedure comprises four steps after each processing. First, a pre-rinse step must be done immediately after each production by recirculation of hot water (50°C) for at least 5 min to eliminate all traces of milk from the system (Figure 2). The second step is an alkaline wash using a detergent with a sodium hypochlorite basis (SI-20, SIVE Fluid Systems) at 75°C for 30 min, followed by a rinsing cycle. The third step is an acid wash using a cleaner based on hydrochloric acid (SI-40, SIVE Fluid Systems) at 50°C for 30 min, followed by a rinsing round until the rinsing water has a pH value of 6 to ensure that all traces of acid cleaner have been removed. Finally, the fourth step is a thermal sanitizing, as described above, which is performed just before starting the operation of the system. The effectiveness of this thermal sanitizing step was checked after each of 36 processing cycles by microbiological analysis.

### VI. 3.3. Microbiological performance testing

A sample of water taken at the end of the sanitation step, and prior the processing of a DHM production batch, was seeded directly on BHI agar for microbiological analysis. A total of 36 samples of hot water were taken and tested over the course of this study, and only in four of them bacterial growth was observed with total viable counts of  $2.3 \pm 0.28 \log_{10} \text{ cfu/mL}$ . Further identification of the isolates found in these four samples using MALDI-TOF MS revealed that *Bacillus cereus* was the only microorganism capable of surviving this cleaning procedure.

The performance of the equipment was evaluated after the processing of 14 production batches of DHM at different temperatures and holding times, and the results were compared with those obtained after the classical Holder pasteurization of an aliquot of each production batch.

The global microbiological analysis of the raw DHM used for the 14 production batches revealed the presence of microorganisms in all the samples when cultured in any of the culture media (BHI, CNA, MCK, and KAA) employed in this study (Table 2). Globally, the mean bacterial counts in DHM samples (N=14) before the heat treatment oscillated between 3.96 and 4.76  $\log_{10} \text{ cfu/mL}$  in MCK and BHI, respectively (Figure 5); there was not a statistically difference in the mean values of



the bacterial counts obtained in the different media (Table 3; one-way ANOVA:  $F=2.46$ ,  $p=0.073$ ). A statistically significant positive linear correlation was found between the total bacterial counts obtained in all the different culture media but it was remarkable high ( $r=0.951$ ,  $p<0.000$ ) for bacterial counts on BHI (a non-selective agar medium) and MCK (a more selective media for Gram-negative bacteria). However, identification of the isolates obtained in the different growth media revealed their poor selectivity since some bacterial species could be isolated from up to three different growth media (i.e., *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus epidermidis* were isolated from BHI, CNA and KAA plates) (Figure 6).

The number of different microorganisms in a same raw DHM production batch ranged from 3 to 10, although 7 was the most frequent number (Figure 6). In relation to Gram-positive bacteria, *S. epidermidis* and *E. faecalis* were present in all raw DHM batches ( $N=14$ ) with a mean count value of 4.16 and 3.97  $\log_{10}$  cfu/mL, respectively (Table 4). Other staphylococcal species such as *Staphylococcus aureus* (in 50% of the samples) and *Staphylococcus lugdunensis* (in 43% of the samples) were also isolated frequently but having slightly lower total viable counts (3.55 and 3.52  $\log_{10}$  cfu/mL, respectively).

The variety of Gram-negative bacteria identified was wider and globally included isolates belonging to eight genera (Figure 6, Table 4). The species most frequently found in this group was *Klebsiella oxytoca* (in 50% of raw DHM batches), followed by *Acinetobacter ursingii* (36%) and members of the *Enterobacter cloacae* complex (36%), having lower mean count values (3.12, 3.25 and 2.78  $\log_{10}$  cfu/mL, respectively) when compared to Gram-positive isolates (Table 4). Although the frequency of detection of some species of *Pseudomonas* and *Stenotrophomonas* in raw DHM was lower, such bacteria reached the highest levels (5.10 and 4.78  $\log_{10}$  cfu/mL for *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens*, respectively) in the batches where they could be isolated from. Yeasts were scarcely isolated (Table 4).

The efficacy of the HTST system regarding the microbial inactivation was determined at 70, 72 and 75°C using holding times ranging from 5 to 25 s. The only survivors were detected in four production batches and were identified as *B. cereus* and *E. faecalis* (Tables 5 and 6). *B. cereus* was recovered at levels ranging from 1.95 to 2.62  $\log_{10}$  cfu/mL in four production batches (one batch from treatment at 70°C, two at 72°C and one at 75°C), independently of the holding time (Table 6). *E. faecalis* was isolated in two production batches after processing at 70°C and, also, in one batch after processing at 72°C for 5 s (KAA plate), but it was not recovered when this temperature (72°C) was held for longer time ( $>5$  s) (Table 6). Bacterial growth was not detected in any MCK plate (the detection limit of the method was  $\sim 20$  cfu/mL), indicating the destruction of all Gram-negative bacteria even at the lowest temperature and the shortest time for the heat treatments investigated in this work (Table 5).

The analysis of PFGE profiles of these enterococci isolated from DHM samples before and after different heat treatments, and recovered from different culture media, revealed the existence of, at least, four pulsotypes that matched closely with the production batches (Figure 7). The same pulsotype was shared by *E. faecalis* isolates recovered from milk samples taken from the same production batch before (L13C, L13B, L13K) and after (L13.1A, L13.1B, L13.1C, L13.1D, L13.1E) the heat treatment. Isolates from different batches did not share the same PFGE profile, except for two production batches (L23 and L24) where the same profile was shared by all 9 isolates. In one production batch (L26), two different profiles (or pulsotypes) were found before heat treatment (L26B/L26C and L26K) but, only one was recovered after the heat treatment (L26.1E = L26B/L26C).

Bacterial survival after Holder pasteurization of DHM samples (N=14) was observed in 4 batches when pasteurized milk samples were cultured on BHI agar plates ( $2.25 \pm 0.13 \log_{10}$  cfu/mL) (Table 5). In all of these cases, *B. cereus* was the microorganism isolated (Table 6). No other microorganism was detected neither in BHI nor in CNA, KAA or MCK plates after Holder pasteurization, indicating the inactivation of the rest of the microorganisms that were present initially in pooled raw DHM.

#### VI. 3.4. Enzymatic markers of heat-treatment in DHM

The activities of ALP and GGTP, two enzymes naturally present in milk, can be used as indicators of the intensity of a heat treatment. Unheated DHM exhibited a mean (95% CI) value of ALP activity of 115.96 (89.20 – 142.72) nmoles of *p*NP/mL min (Figure 7). This enzyme was completely inactivated after Holder pasteurization of DHM (Table 7). In DHM heated at 70°C there was a small amount of remaining activity, ranging from 15% after 5 s to 3% after 25 s, but the enzyme was completely destroyed at 72 and 75°C, even at the shorter time of treatment (5 s) (Figure 7 and Table 7).

The mean (95% CI) value of the activity of GGTP in unheated DHM was 2.09 (1.70 – 2.50)  $\mu$ mol of *p*NA/mL min (Figure 8). This enzyme was also destroyed after Holder pasteurization but its thermostability was higher than that of ALP (2-3% of remaining activity) (Table 7). Production batches of DHM heated at 70°C retained a significant amount of GGTP activity, ranging from 84% after 5 s to 57% after 25 s. HTST treatment caused a progressive destruction of this enzyme with increasing temperatures and holding times, although about 24% of activity could be still detected after heating at 72°C for 25 s. At 75°C, the enzyme was inactivated and, in fact, there was no significant difference between the remaining GGTP activity after Holder pasteurization and after HTST treatment at 75°C and the different holding times (one-way ANOVA,  $p=0.348$ ) (Table 7).

### VI. 3.5. Chemical indicators of heat-treatment in DHM

Furosine was detected in all DHM samples analyzed, both before and after any of the applied heat treatments, and its content is presented in Table 8. Furosine levels in non-heated samples (n=10) ranged from 1.3 to 2.5 mg/100 g protein, with a mean value of 2.1 mg/100 g protein. A clear trend toward increasing furosine concentrations with increasing temperature and time of treatment was noted. However, the amount of furosine found in HTST-treated DHM in the conditions employed in this study (temperature range 70-75°C and holding times 5-25 s) did not differ significantly from the amount found in untreated milk (Table 8). In contrast, Holder pasteurization of DHM increased significantly the concentration of furosine (mean value of 4.7 mg/100 g protein) in comparison with untreated DHM (paired Student *t*-test,  $p<0.000$ ).

Lactulose was not detected neither in non-heated or HTST-treated DHM, but it was found in all Holder-pasteurized samples. In fact, nine samples of HTST-treated DHM had measurable amounts of this compound with a mean (95% CI) concentration of 22.22 (15.51 – 28.93) mg/L; in the remaining sample, lactulose was present but below the quantification limit of the method (10 mg/L).

## VI. 4. DISCUSSION

Using DHM in NICUs has resulted in substantial improvements in neonatal outcomes of premature infants. This fragile group is at a high risk of death and prone to many medical complications derived from their immature organs and systems, that are not prepared to support life in the extrauterine environment (de Halleux *et al.*, 2017). Precisely, HMBs have played a decisive role extending the benefits of human milk administration to preterm infants that, otherwise, would receive formula milk, as their mothers do not produce adequate amounts of milk, as well as to other high-risk infants. At present, there are more than 650 HMB, the most important providers of DHM to NICUs, around the world. And, some more are planned to open in a near future to foster the use of DHM in preterm infants (Haiden and Ziegler, 2016), following the recommendations of influent organisms such as the World Health Organization (WHO, 2017), the European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN *et al.*, 2013), the Human Milk Banking Association of North America (HMBANA, 2017), and the American Academy of Pediatrics (AAP, 2012).

There has been some controversy regarding the use of raw or pasteurized DHM. In a few countries, such as Japan and Norway, there is a long tradition of administering raw DHM having the advantage of providing all bioactive components, but it requires a strict control and screening of donors (Grøvslien and Grønn, 2009; Mizuno *et al.*, 2015). On the other hand, DHM is a potential vehicle for bacteria and viruses and a highly perishable biological fluid derived from other individuals. Therefore, it should be processed in order to guarantee its safety. In spite of undesirable changes related to heat treatment, pasteurized DHM still retains some beneficial and protective effects, and it is preferred to infant formula (Quigley and McGuire, 2014; Sisk *et al.*, 2016). Unfortunately, the pasteurizers commercially available at present are very limited regarding the retention of some bioactive components and the amount of milk that can be processed (between 4 and 10 L per batch); in short, globally the supply of DHM is limited (Underwood, 2013).

In this study, we document the development of an HTST system specifically designed to fulfill the needs of a HMB for processing DHM. The HTST system constructed and presented here allows performing fast and continuous pasteurization of high (>10 L) and variable amounts (according to the availability) of DHM in controlled conditions. The heat exchangers were designed and constructed having maximum surface area of contact between the two fluids (DHM and hot/cold water) and minimum resistance to fluid flow in order to favor heat interchange. The counter-current arrangement of the relative flow of milk and the heating or cooling fluids and the corrugated surface of the tubes also significantly enhance the rate of heat transfer. The heat exchangers were mounted slightly inclined in the milk flow direction in order to have a self-draining design and a small dead volume (about 300 mL), thereby minimizing DHM losses. In addition, the heat treatment is independent of the packaging, which is

done manually, allowing packing pasteurized DHM in accordance with the needs and preferences of the HMB. CIP cleaning and sanitation of the whole HTST system before operation without dismantling the equipment and direct manipulation of cleaning detergents contributes to enhance safety and DHM quality. In conclusion, the main characteristics of this HTST unit are comparable to commercial-scale equipment operating in dairy industry, although it is better suited for processing smaller volumes of milk in order to provide a reliable, safe and abundant source of DHM.

Bacteria could be isolated from all the raw human milk batches in the different culture media employed in this study. This finding is not strange since fresh breast milk has been shown to be a continuous source of commensal bacteria to the infant gut, including staphylococci, streptococci, corynebacteria, and enterococci (Fernández *et al.*, 2013). The high concentrations of enterobacteria, *Pseudomonas* spp. and other Gram-negative bacteria found in some of the samples may be explained by the fact that donors extracted the milk using pumps; milk extraction using these devices has been associated to high counts of such bacterial groups, which are not usual components of the human milk microbiota. Contaminating bacteria, arising from environment or rinsing water (Cervia *et al.*, 2008; Fihman *et al.*, 2012; Cohen *et al.*, 2017) or being the result of poor hygienic practices (Boo *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2005), may persist in milk pumps and/or their accessories, even after application of current cleaning protocols (Marín *et al.*, 2009). Therefore, the design of new pumping devices that can be sterilized and subjected to more efficient cleaning and disinfection procedures is highly desirable.

The purpose of pasteurization is making DHM safe for consumption, *i.e.*, destroying all common pathogens to meet at least five-log reduction (99.999% killing of the population of microorganism present), although it is ineffective in destroying spore-forming bacteria (Sarkar, 2015). Refrigeration or freezing of pasteurized DHM controls the growth of any remaining microorganisms. In order to reach the pasteurization objective, this process should be implemented to heat the milk evenly, at a consistent temperature and for the correct time, and no part of the milk should be subjected at a lower temperature or for a shorter time. The pasteurization efficacy, or the extent of microorganism destruction, and the associated nutritional and biological quality loss are a function of both temperature and holding time at that temperature. Adequate design of the equipment, as described previously, plays a pivotal role in order to reach this objective.

The microbiological quality of pasteurized DHM depends on the initial microbiota present in raw DHM, the specific processing conditions applied, and the storage conditions. Therefore, donors should receive a good education on hygienic milk extraction (particularly regarding the use of pumps as there is significant risk of contamination from these devices) and storage from the HMB staff. In addition, HMB professionals should control environmental contamination on the management of DHM (Becker *et al.*, 2015).

Only two bacterial species (*B. cereus* and *E. faecalis*) were able to survive (although at low concentrations) in some of the batches after the HTST treatments tested in this work. Milk commensal and contaminant vegetative bacterial cells are usually killed by standard pasteurisation processes but spore-forming bacteria, such as *B. cereus*, may survive the treatment (Almutawif *et al.*, 2017; de Segura *et al.*, 2012; Landers and Updegrave, 2010); subsequently, such bacteria can grow in heat-treated milk even faster than in raw milk because of the heat damage to the milk bacteriostatic systems and the absence of competitors (Ford *et al.*, 1977). In agreement with our results, *B. cereus* is the predominant and, often, the only contaminant in those human milk samples that are positive for bacterial growth after Holder pasteurisation (Landers and Updegrave, 2010). *B. cereus* is described as being of ubiquitous presence in nature; in addition to a full life cycle in soil, where it is richly present, it is also adapted to human hosts, either as a pathogen or, more frequently, as a part of the intestinal microbiota of a healthy host (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). Additionally, it has been found in breast milk of healthy rhesus monkeys (Jin *et al.*, 2011), in cows' milk (Magnusson *et al.*, 2007), and in pooled breast milk after poor hygienic practices during its manipulation (Decousser *et al.*, 2013). Although any milk bottle with a culture-positive result after pasteurisation is rejected by HMB, a previous study revealed that all *B. cereus* strains isolated from pasteurised milk did not possess a high virulence potential (de Segura *et al.*, 2012). However, as the level of virulence is highly variable among different strains (Decousser *et al.*, 2013), caution is strongly required when dealing with this species.

Despite *E. faecalis* is not a spore-forming species, it was isolated in one production batch after HTST processing at 72°C for 5 s but it was completely destroyed after milk processing at 72°C for longer holding times (>5 s) or at 75°C (independently of the holding time). Therefore, the later treatments were efficient in killing any vegetative cell initially present in raw human milk samples. Enterococci, and particularly *E. faecalis*, are natural members of the human and animal intestinal microbiota and are also widespread in the environment. During and shortly after birth, newborn infants are colonized with enterococci (Gómez *et al.*, 2016; Moles *et al.*, 2015) and, although the risk for colonization with multidrug-resistant enterococci increases in preterm newborns, most of them remain uninfected (Hufnagel *et al.*, 2007). However, *E. faecalis* and *Enterococcus faecium* are nosocomial, opportunistic pathogens, known to cause late-onset sepsis in preterm neonates and are notorious for their association with resistance to commonly used antibiotics, such as penicillin, ampicillin, aminoglycosides, and vancomycin (Kumar *et al.*, 2015; Lister *et al.*, 2015). Therefore, raw DHM should receive a heat treatment compatible with the complete killing of these enterococcal species.

Molecular analysis of enterococci isolated before and after the heat treatment showed a variety of strains present in raw DHM. Isolates displaying the same RAPD and PFGE profiles were present in two different batches what may be explained as

they shared DHM from the same donors. The isolates that survived the heat treatment (70°C for 5 to 25 s and 72°C for 5 s) were always detected in the raw DHM used for the batch, as confirmed by PFGE. The thermotolerance of *E. faecalis* and *E. faecium* seems to be due to the synthesis of a number of heat shock proteins and, among them, DnaK and GroEL are the best characterized at present (Boutibonnes *et al.*, 1993; Martínez *et al.*, 2003; Rince *et al.*, 2000; Silva Laport *et al.*, 2003). Boutibonnes *et al.* (1993) showed that the heat resistance (60-62.5°C, 30 min) of log phase cells of *E. faecalis* grown at 37°C was enhanced by exposing cells to a prior heat shock at 45-50°C for 30 min. Similarly, Silva Laport *et al.* (2003) reported that at least some *E. faecium* cells could remained viable after 2 h of incubation at 70°C. Globally, it means that the conditions for routine pasteurization of human milk must be chosen very carefully after a tough validation process, such as the described in the present study.

ALP is a membrane-bound glycoprotein that is found in most human tissues and is relevant in clinical chemistry as it serves as indicator of physiological functions and certain diseases. The role of milk ALP in health and nutrition of the newborn infant is uncertain (Bjelakovic *et al.*, 2009). However, in dairy industry it has been used traditionally for the evaluation of milk pasteurization processes due to the close relationship between its thermal resistance and the different time-temperatures treatments required for effective pasteurization (Kay and Graham, 1935). The main advantage is that the result would be available in a short time allowing to take preliminary decisions about the processed batch in the milk bank. The usefulness of an enzyme indicator depends not only on the amount of the enzyme present in the milk and the sensitivity of the enzymatic assay, but also on the decimal reductions required for the microbial targets. Although the ALP activity in DHM was variable, no activity could be found either after HTST treatment at both 72 and 75°C. In addition, progressive inactivation was observed at 70°C with increasing treatment time. Therefore, ALP does not seem to be a useful indicator for proper heat treatment, as it is completely destroyed at milder HTST treatments than those required for appropriate bacterial destruction (72°C, 15 s).

In dairy industry it has been known for long time that ALP reactivates under certain conditions and alternative indigenous enzymes have been proposed. GGTP, another glycoprotein associated to mammalian tissue and found both in the skim milk fraction and in the milk fat globule membrane, has been the most promising alternative (Fox and Kelly, 2006). GGTP has higher thermal resistance than ALP but its activity is lost gradually at 72°C when processing time increases. In contrast, when DHM was processed at 75°C its activity was lost and, therefore, it could be useful as an indicator of DHM pasteurization, as suggested by Dhar *et al.* (1996). In fact, the reduction of ALP and GGTP activities obtained in this work is similar to that reported by Dhar *et al.* (1996) in DHM. Both enzymes, ALP and GGTP, have simple colorimetric methods and, therefore, could be used as quick, simple, and inexpensive tests. However,

additional experiments are needed to confirm its inactivation kinetics before its potential can be exploited.

Heat treatment of milk triggers different chemical reactions involving lactose such as the Maillard reaction, after reaction with proteins, and isomerization. The extent of both reactions depends strongly on the processing conditions (Olano *et al.*, 1989). Lactulose, which is mainly formed by isomerization of lactose, is not present naturally in raw DHM and was not present in any heat treated DHM samples in this work. Previously it was reported that this compound, quantified by using an enzymatic-spectrophotometric method, could be used as a process indicator for commercially pasteurized and direct UHT-treated cow milk samples (Marconi *et al.*, 2004). On the other hand, the Maillard reaction is related to cooked flavour and loss of nutritional value in milk due to new substances formed such as furosine. In contrast to lactulose, furosine was detected in both Holder-pasteurized and HTST-treated DHM and their concentrations were 2× and 1.5× times of that found in raw DHM. However, these differences, that indicate the high sensibility of the analytical technique, do not have practical relevance. Taken together, the absence of lactulose and the low amount of furosine found in HTST-treated DHM strongly indicate that this heat-treatment does not induce significant heat damage in DHM.

Heat treatment of milk always results in some undesirable changes, being their extent related to the temperature and duration of heating. Other treatments have been proposed as alternatives to DHM thermal processing, including high pressure processing or UV irradiation. Both alternatives seem to better preserve some biological components, such as total immunoglobulin A or lysozyme activity, compared to Holder pasteurization (Christen *et al.*, 2013; Mayayo *et al.*, 2015; Sousa *et al.*, 2016). However, they require further investigation about the influence on other milk components as well as performing exhaustive microbiological analyses before they could be used to treat DHM.





## VI. 5. REFERENCES

- AAP (American Academy of Paediatrics). Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics*. 2012; 129:600–3.
- Almutawif Y, Hartmann B, Lloyd M, Erber W, Geddes D. A retrospective audit of bacterial culture results of donated human milk in Perth, Western Australia. *Early Hum Dev*. 2017; 105:1–6.
- Baro C, Giribaldi M, Arslanoglu S, Giuffrida MG, Dellavalle G, et al. Effect of two pasteurization methods on the protein content of human milk. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2011; 3:818–29.
- Becker GE, Smith HA, Cooney F. Methods of milk expression for lactating women (Review). *Cochrane Database Syst Rev*. 2015; 2:CD006170.
- Bjelakovic L, Kocic G, Cvetkovik T, Stojanovic D, Najman S, et al. Alkaline phosphatase activity in human milk during the first month of lactation. *Acta Facultatis Medicae Naissensis*. 2009; 26:43–7.
- Boo NY, Nordiah AJ, Alfizah H, Nor–Rohaini AH, Lim VK. Contamination of breast milk obtained by manual expression and breast pumps in mothers of very low birthweight infants. *J Hosp Infect*. 2001; 49:274–81.
- Boutibonnes P, Giard JC, Hartke A, Thammavongs B, Auffray Y. Characterization of the heat shock response in *Enterococcus faecalis*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1993; 64:47–55.
- Brown SL, Bright RS, Dwyer DE, et al. Breast pump adverse events: reports to the Food and Drug Administration. *J Hum Lact*. 2005; 21:169–74.
- Cervia JS, Ortolano GA, Canonica FP. Hospital tap water as a source of *Stenotrophomonas maltophilia* infection. *Clin Infect Dis*. 2008; 46:1485–7.
- Chiavarini M, Bragetti P, Sensini A, Cenci E, Castronari R, et al. Breastfeeding and transmission of cytomegalovirus to preterm infants. Case report and kinetic of CMV-DNA in breast milk. *Ital J Pediatr*. 2011; 37:6.
- Christen L, Lai CT, Hartmann B, Hartmann PE, Geddes DT. Ultraviolet-C irradiation: a novel pasteurization method for donor human milk. *PLoS One*. 2013; 8:e68120.
- Christen L, Lai CT, Hartmann B, Hartmann PE, Geddes DT. The effect of UV-C pasteurization on bacteriostatic properties and immunological proteins of donor human milk. *PLoS One*. 2013; 8:e85867.
- Cohen R, Babushkin F, Shimoni Z, Cohen S, Litig E, et al. Water faucets as a source of *Pseudomonas aeruginosa* infection and colonization in neonatal and adult intensive care unit patients. *Am J Infect Control*. 2017; 45:206–9.

- de Halleux V, Pieltain C, Senterre T, Rigo J. Use of donor milk in the neonatal intensive care unit. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2017; 22:23–9.
- de Segura AG, Escuder D, Montilla A, Bustos G, Pallás C, et al. Heating-induced bacteriological and biochemical modifications in human donor milk after holder pasteurisation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012; 54:197–203.
- Decousser JW, Ramarao N, Duport C, Dorval M, Bourgeois–Nicolaos N, et al. *Bacillus cereus* and severe intestinal infections in preterm neonates: putative role of pooled breast milk. *Am J Infect Control.* 2013; 41:918–21.
- DeMarchis A, Israel-Ballard K, Mansen KA, Engmann C. Establishing an integrated human milk banking approach to strengthen newborn care. *J Perinatol.* 2016. (Ahead of print). Doi: 10.1038/jp.2016.198.
- Dhar J, Fichtali J, Skura BJ, et al. Pasteurization efficiency of a HTST system for human milk. *J Food Sci.* 1996; 61:569–72.
- DiLauro S, Unger S, Stone D, O'Connor DL. Human milk for ill and medically compromised infants: strategies and ongoing innovation. *J Parenter Enteral Nutr.* 2016; 40:768–82.
- Donalisio M, Cagno V, Vallino M, Moro GE, Arslanoglu S, et al. Inactivation of high-risk human papillomaviruses by Holder pasteurization: implications for donor human milk banking. *J Perinat Med.* 2014; 42:1–8.
- Escuder-Vieco D, Vázquez-Román S, Sánchez-Pallás J, Ureta-Velasco N, Mosqueda-Peña R, et al. Determination of acidity in donor milk. *J Hum Lact.* 2016; 32:73–5.
- ESPGHAN, Arslanoglu S, Corpeleijn W, Moro G, Braegger C, et al. Donor human milk for preterm infants: Current evidence and research directions. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2013; 57:535–42.
- Espinosa-Martos I, Montilla A, de Segura AG, Escuder D, Bustos G, et al. Bacteriological, biochemical, and immunological modifications in human colostrum after Holder pasteurisation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2013; 56:560–8.
- Fernández L, Langa S, Martín V, Jiménez E, Martín R, et al. The microbiota of human milk in healthy women. *Cell Mol Biol.* 2013; 59:31–42.
- Fihman V, Le Monnier A, Corvec S, Jauregui F, Tankovic J, et al. *Stenotrophomonas maltophilia* – the most worrisome treat among unusual non-fermentative gram-negative bacilli from hospitalized patients: a prospective multicenter study. *J Infection.* 2012; 64:391–8.
- Ford JE, Law BA, Marshall VME, Reiter B. Influence of the heat treatment of human milk on some of its protective constituents. *J Pediatr.* 1977; 90:29–35.

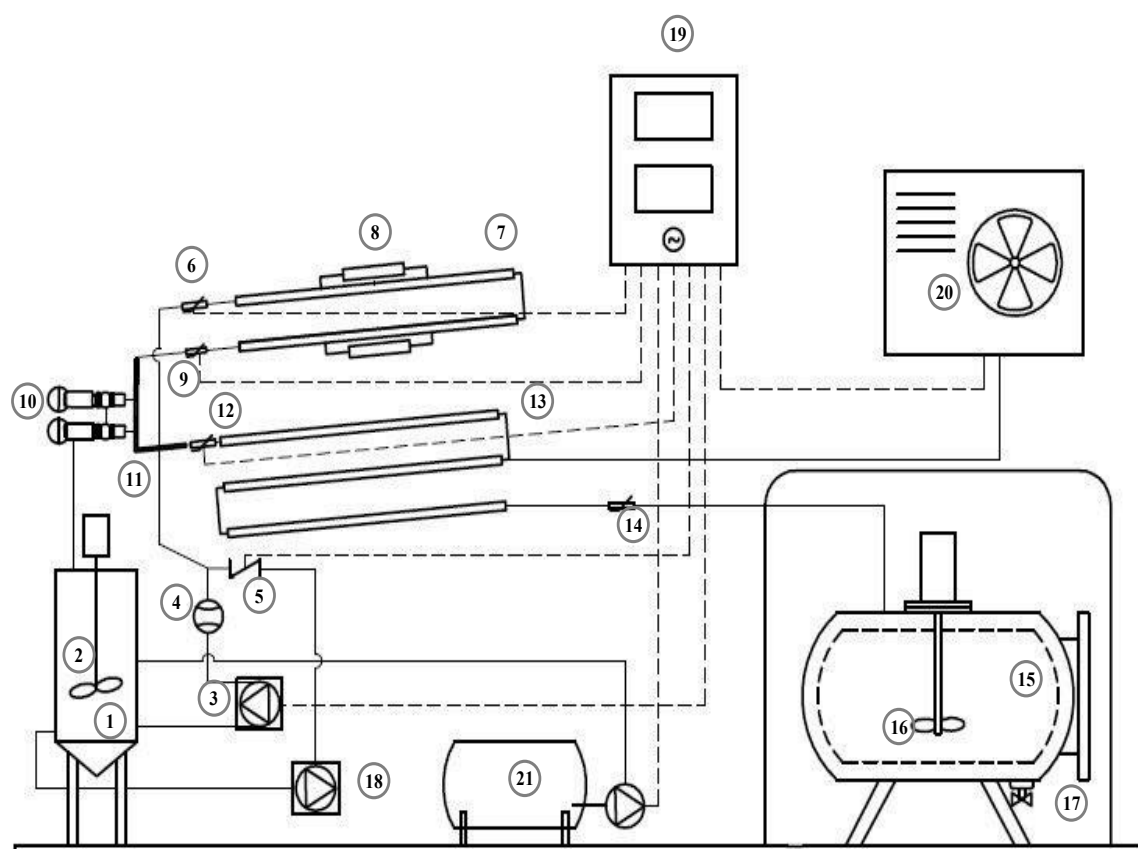
- Fox PF, Kelly AL. Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects—Part 2. *Int Dairy J*. 2006; 16:517–32.
- Giribaldi M, Coscia A, Peila C, et al. Pasteurization of human milk by a benchtop High Temperature Short-Time device. *Innov Food Sci Emerg Technol*. 2016; 36:228–33.
- Godambe S, Shah PS, Shah V. Breast milk as a source of late-onset neonatal sepsis. *Pediatr Infect Dis J*. 2005; 24:381–2.
- Goelz R, Hihn E, Hamprecht K, Dietz K, Jahn G, et al. Effects of different CMV heat-inactivation-methods on growth factors in human breast milk. *Pediatr Res*. 2009; 65:458–61.
- Goldblum RM, Dill CW, Albrecht TB, et al. Rapid high-temperature treatment of human milk. *J Pediatr*. 1984; 104:380–5.
- Gómez M, Moles L, Melgar A, Ureta N, Bustos G, et al. Early gut colonization of preterm infants: effect of enteral feeding tubes. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2016; 62:893–900.
- Gras-Le GC, Lepelletier D, Debillon T, Gournay V, Espaze E, et al. Contamination of a milk bank pasteuriser causing a *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a neonatal intensive care unit. *Arch Dis Child Fetal Neonatal*. 2003; 88:F434–5.
- Grøvslien AH, Grønn M. Donor milk banking and breastfeeding in Norway. *J Hum Lact*. 2009; 25:206–10.
- Haiden N, Ziegler EE. Human milk banking. *Ann Nutr Metab*. 2016; 69:8–15.
- Hamilton Spence E, Huff M, Shattuck K, Vickers A, Yun N, et al. Ebola virus and Marburg virus in human milk are inactivated by Holder pasteurization. *J Hum Lact*. 2017. (Ahead of print). Doi: 10.1177/0890334416685564.
- HMBANA (Human Milk Banking Association of North America). The value of human milk. 2017. Available from URL: <https://www.hmbana.org/sites/default/files/images/position-paper-donor-milk.pdf>. (Last accessed April 2017).
- Hufnagel M, Liese C, Loescher C, Kunze M, Proempeler H, et al. Enterococcal colonization of infants in a neonatal intensive care unit: associated predictors, risk factors and seasonal patterns. *BMC Infect Dis*. 2007; 16:7:107.
- Isaacs CE. Human milk inactivates pathogens individually, additively, and synergistically. *J Nutr*. 2005; 135:1286–8.
- Jeurink PV, van Berghenhenegouwen J, Jiménez E, Knippels LMJ, Fernández L, et al. Human milk: a source of more life than we imagine. *Benef Microbes*. 2013; 4:17–30.

- Jiménez E, Delgado S, Maldonado A, Arroyo R, Albújar M, et al. *Staphylococcus epidermidis*: a differential trait of the fecal microbiota of breast-fed infants. *BMC Microbiol.* 2008; 8:143.
- Jin L, Hinde K, Tao L. Species diversity and relative abundance of lactic acid bacteria in the milk of rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *J Med Primatol.* 2011; 40:52–8.
- Kay HD, Graham WR. The phosphatase test for pasteurized milk. *J Dairy Res.* 1935; 6:191–203.
- Kumar A, Kumar P, Basu S. *Enterococcus faecalis* sepsis and leukemoid reaction: an unusual association at birth. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2015; 37:e419–20.
- Landers S, Updegrove K. Bacteriological screening of donor human milk before and after Holder pasteurization. *Breastfeed Med.* 2010; 5:117–21.
- Lister DM, Kotsanas D, Ballard SA, Howden BP, Carse E, et al. Outbreak of *vanB* vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* colonization in a neonatal service. *Am J Infect Control.* 2015; 43:1061–5.
- Magnusson M, Christiansson A, Svensson B. *Bacillus cereus* spores during housing of dairy cows: factors affecting contamination of raw milk. *J Dairy Sci.* 2007; 90:2745–54.
- Marconi E, Messia MA, Amine A, Moscone D, Vernazza F, et al. Heat-treated milk differentiation by a sensitive lactulose assay. *Food Chem.* 2004; 84:447–50.
- Marín ML, Arroyo R, Jimenez E, Gomez A, Fernandez L, et al. Cold storage of human milk: effect on its bacterial composition. *J Ped Gastroenterol Nutr.* 2009; 49:343–8.
- Martín R, Langa S, Reviriego C, Jiménez E, Marín ML, et al. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr.* 2003; 143:754–8.
- Martínez S, López M, Bernardo A. Thermal inactivation of *Enterococcus faecium*: effect of growth temperature and physiological state of microbial cells. *Lett Appl Microbiol.* 2003; 37:475–81.
- Mayayo C, Montserrat M, Ramos SJ, et al. Effect of high pressure and heat treatments on IgA immunoreactivity and lysozyme activity in human milk. *Eur Food Res Technol.* 2016; 242:891–8.
- McKellar RC, Emmons DB, Farber J. Gamma-glutamyl transpeptidase in milk and butter as an indicator of heat treatment. *Int Dairy J.* 1991; 1:241–51.
- Mizuno K, Sakurai M, Itabashi K. Necessity of human milk banking in Japan: Questionnaire survey of neonatologists. *Pediatr Int.* 2015; 57:639–4.
- Moles L, Gómez M, Jiménez E, Fernández L, Bustos G, et al. Preterm infant gut colonization in the neonatal ICU and complete restoration 2 years later. *Clin Microbiol Infect.* 2015a; 21:936.e1–10.

- Montilla A, Moreno FJ, Olano A. A reliable gas capillary chromatographic determination of lactulose in dairy samples. *Chromatographia*. 2005; 62:311–4.
- Nakamura K, Kaneko M, Abe Y, Yamamoto N, Mori H, et al. Outbreak of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* transmitted through breast milk sharing in a neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect*. 2016; 92:42–6.
- O'Connor D, Ewaschukd JB, Unger S. Human milk pasteurization: benefits and risks. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2015; 18:269–75.
- Olano A, Calvo MM, Corzo N. Changes in the carbohydrates fraction of milk during heating processes. *Food Chem*. 1989; 31:259–65.
- Orloff SL, Wallingford JC, McDougal JS. Inactivation of human immunodeficiency virus type I in human milk: effects of intrinsic factors in human milk and of pasteurization. *J Hum Lact*. 1993; 9:13–7.
- Peila C, Emmerik NE, Giribaldi M, Stahl B, Ruitenberg JE, et al. Human milk processing: a systematic review of innovative techniques to ensure the safety and quality of donor milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2017; 64:353–63.
- Peila C, Moro GE, Bertino E, Cavallarin L, Giribaldi M, et al. The effect of Holder pasteurization on nutrients and biologically-active components in donor human milk: a review. *Nutrients*. 2016; 8:E477.
- Pfaender S, Vielle NJ, Ebert N, Steinmann E, Alves MP, et al. Inactivation of Zika virus in human breast milk by prolonged storage or pasteurization. *Virus Res*. 2017; 228:58–60.
- Picaud JC, Buffin R. Human milk-treatment and quality of banked human milk. *Clin Perinatal*. 2017; 44:95–119.
- Quigley M, McGuire W. Formula versus donor breast milk for feeding preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014; 22:CD002971.
- Resmini P, Pellegrino L, Batelli G. Accurate quantification of furosine in milk and dairy products by a direct HPLC method. *Ital J Food Sci*. 1990; 2:173–83.
- Rigourd V, Meyer V, Kieffer F, Aubry S, Magny JF. HTLV and "donating" milk. *Bull Soc Pathol Exot*. 2011; 104:205–8.
- Rince A, Flahaut S, Auffray Y. Identification of general stress genes in *Enterococcus faecalis*. *Int J Food Microbiol*. 2000; 55:87–91.
- Sarkar S. Microbiological considerations: pasteurized milk. *Int J Dairy Sci*. 2015; 10:206–18.
- Silva Laport M, da Silva MR, Costa Silva C, do Carmo de Freire Bastos M, Giambiagi-deMarval M. Heat-resistance and heat-shock response in the nosocomial pathogen *Enterococcus faecium*. *Curr Microbiol*. 2003; 46:313–7.

- Silvestre D, Miranda M, Muriach M, Almansa I, Jareno E, et al. Antioxidant capacity of human milk: effect of thermal conditions for the pasteurization. *Acta Paediatr.* 2008; 97:1070–4.
- Sisk PM, Lambeth TM, Rojas MA, Lightbourne T, Barahona M, et al. Necrotizing enterocolitis and growth in preterm infants fed predominantly maternal milk, pasteurized donor milk, or preterm formula. A retrospective study. *Am J Perinatol.* 2016. (Ahead of print). Doi: 10.1055/s-0036-1597326.
- Sousa SG, Delgadillo I, Saraiva JA. Human milk composition and preservation: evaluation of high-pressure processing as a nonthermal pasteurization technology. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2016; 56:1043–60.
- Stenfors Arnesen LP, Fagerlund A, Granum PE. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Rev.* 2008; 32:579–606.
- Terpstra FG, Rechtman DJ, Lee ML, et al. Antimicrobial and antiviral effect of high temperature short-time (HTST) pasteurization applied to human milk. *Breastfeed Med.* 2007; 2:27–33.
- Underwood MA. Human milk for the premature infant. *Pediatr Clin North Am.* 2013; 60:189–207.
- Veyrat A, Miralles MC, Pérez-Martínez G. A fast method for monitoring the colonization rate of lactobacilli in a meat model system. *J Appl Microbiol.* 1999; 87:49–61.
- WHO (World Health Organization). Donor human milk for low-birth-weight infants. 2017. Available from URL: [http://www.who.int/elena/titles/donormilk\\_infants/en/](http://www.who.int/elena/titles/donormilk_infants/en/) (Last accessed April 2017).

## VI. 6. FIGURES

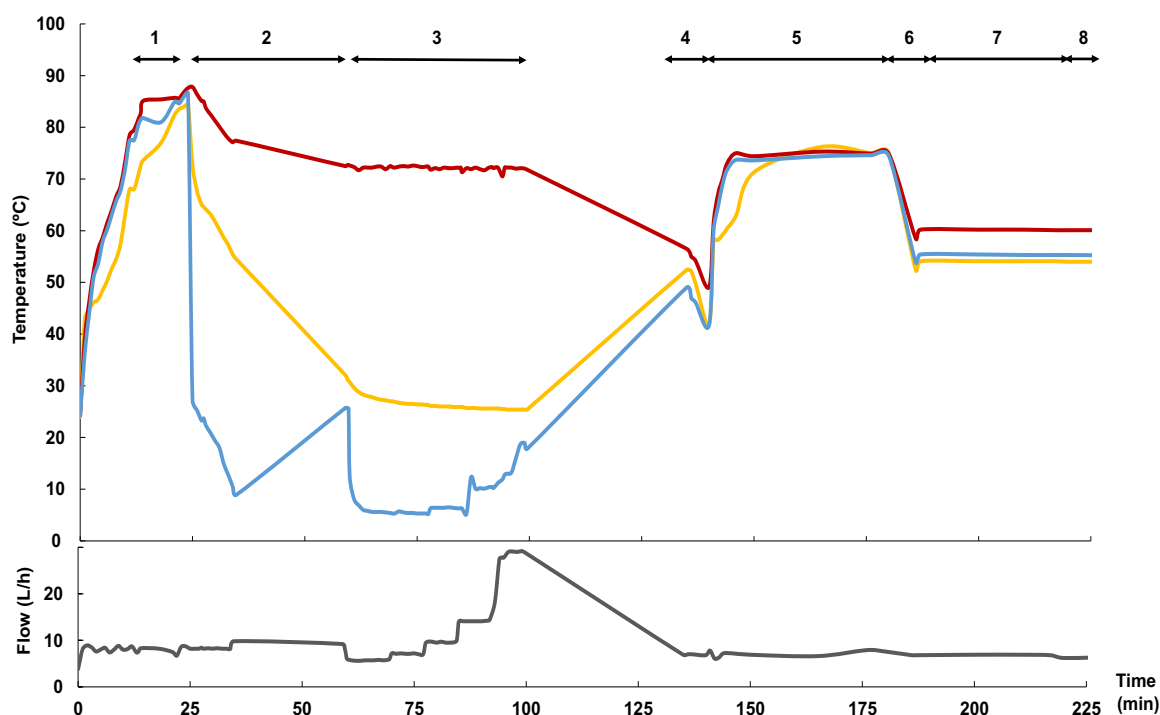


**Figure 1a.** HTST system developed to process DHM. Schematic diagram of the HTST equipment showing its basic components and milk flow. 1: Feed vessel for raw milk; 2: Stirring system; 3: Peristaltic pump; 4: Flowmeter; 5: Backflow valve; 6: Temperature probe; 7: Heating section; 8: Thermal resistances; 9: Temperature probe; 10: Safety valves; 11: Holding tube; 12: Temperature probe; 13: Cooling section; 14: Temperature probe; 15: Closed isothermal tank for pasteurized milk; 16: Stirring system; 17: Filling system; 18: Secondary pump; 19: Control unit; 20: Cold generation equipment; 21: Air compressor.

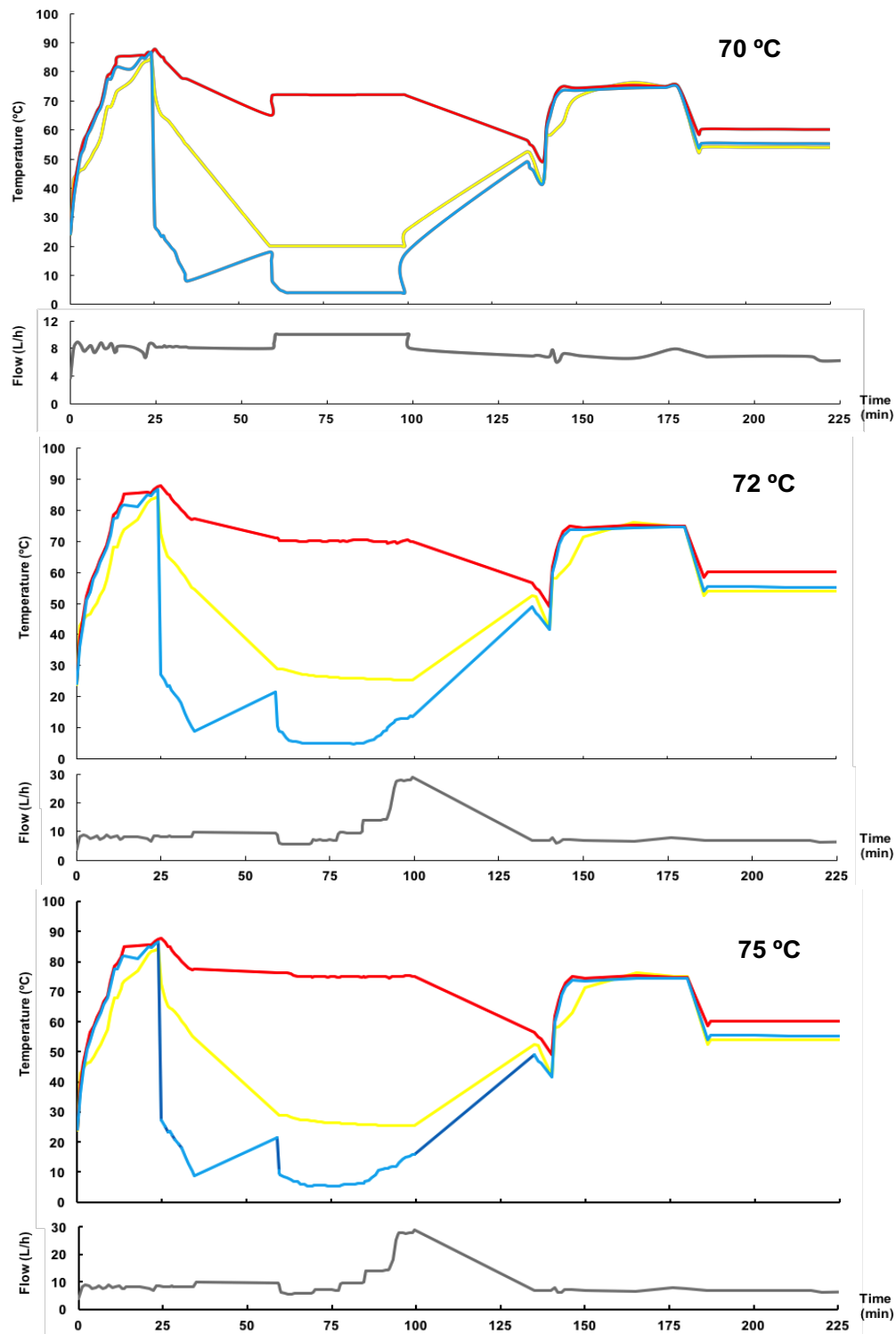




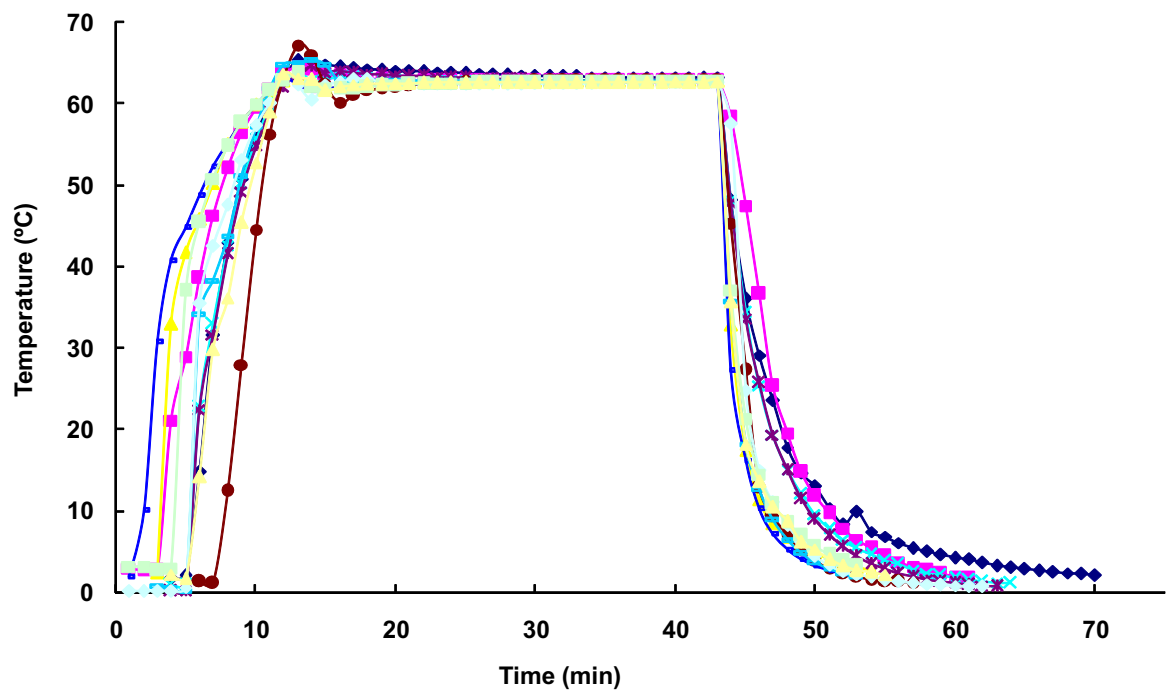
**Figure 1b.** Equipment for the HTST treatment of donor milk at the Human Milk Bank.



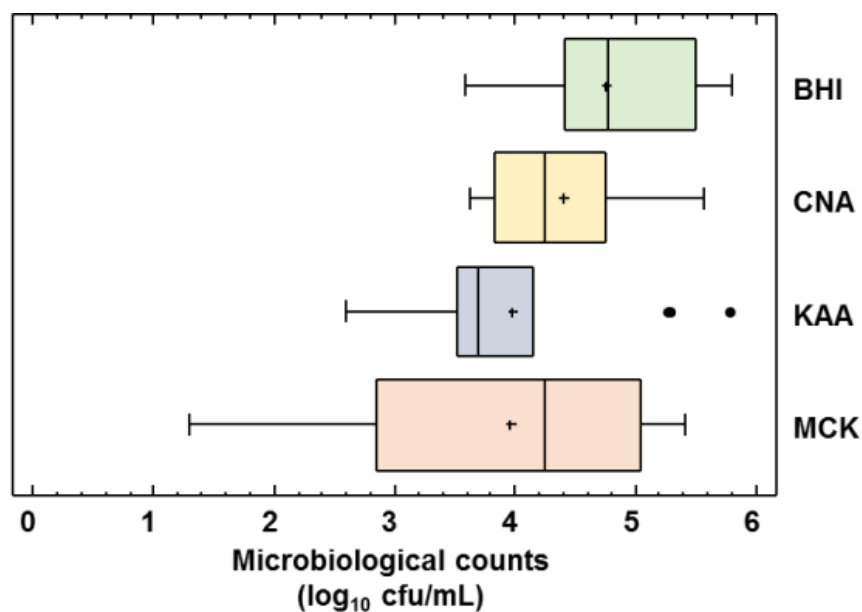
**Figure 2.** Time-temperature and fluid flow profiles of a representative HTST process showing its main steps: 1, sanitizing; 2, conditioning and 3, heat processing and cooling. The inlet temperature in the heating section (either hot water in steps 1 and 2, raw DHM in step 3, or water or cleansing solutions in steps 4 to 8) is shown in yellow; the temperature of the fluid at the exit of the holding tube is shown in red; and, the temperature of the fluid at the exit of the cooling section is shown in blue. The grey line at the bottom represents the fluid flow. The steps of the CIP procedure have been also included (4, pre-rinse; 5, alkaline wash; 6, rinse; 7, acid wash; and 8, final rinse).



**Figure 3.** Time-temperature and fluid flow profiles of representative HTST treatments at 70, 72 and 75°C showing the adjustment of DHM flow in order to obtain different holding times. The DHM temperature at the inlet of the heating section is shown in yellow, at the exit of the holding tube is shown in red, and at the exit of the cooling section is shown in blue; the grey line represents the fluid flow.



**Figure 4.** Time-temperature profiles of heating and cooling curves during Holder pasteurization of different batches of DHM (N=14; each color represents the pasteurization of a production batch).



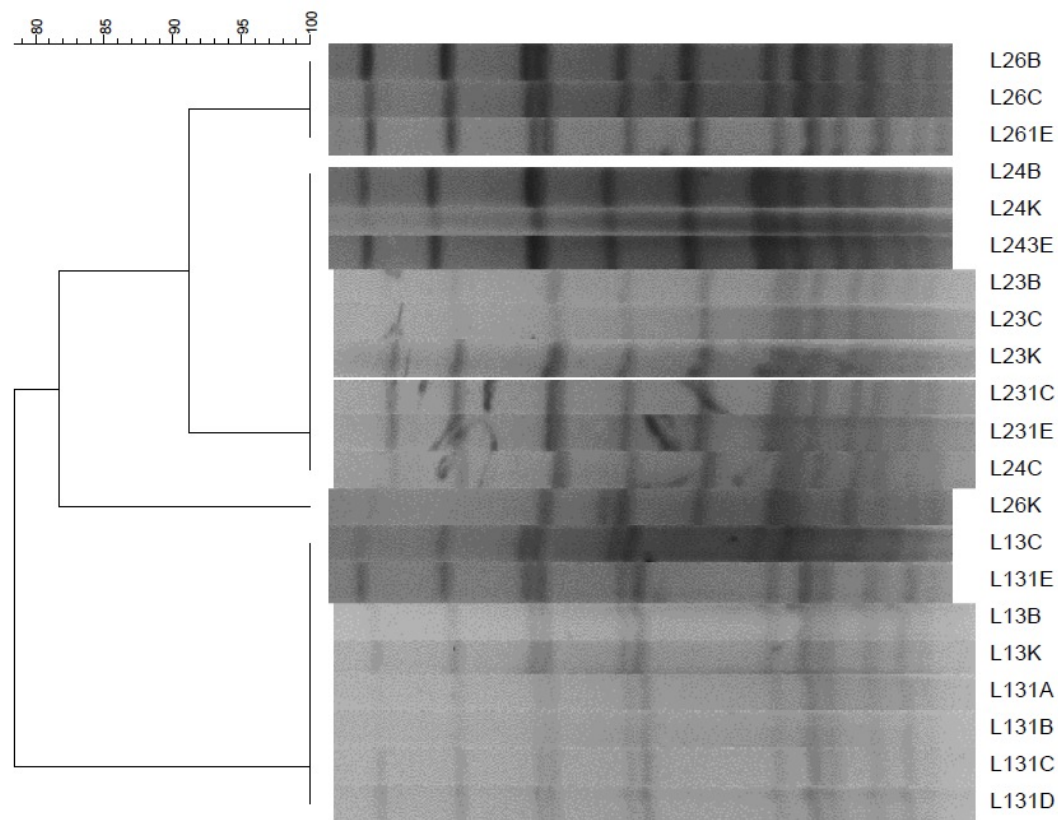
**Figure 5.** Total microbiological counts of all the raw DHM batches used for heat processing trials (N=14) in BHI, CNA, KAA, and MCK agar plates. The central rectangle represents the interquartile range (IQR), the line and the cross inside the rectangle shows the median and the mean, respectively; the whiskers indicate the maximum and minimum values, and the black dots outside the rectangles are suspected outliers ( $>1.5$  IQR).

BHI, Brain Heart Infusion; CNA, Columbia Nalidixic Acid; KAA, Kanamycin Aesculin Azide; and MCK, MacConkey.

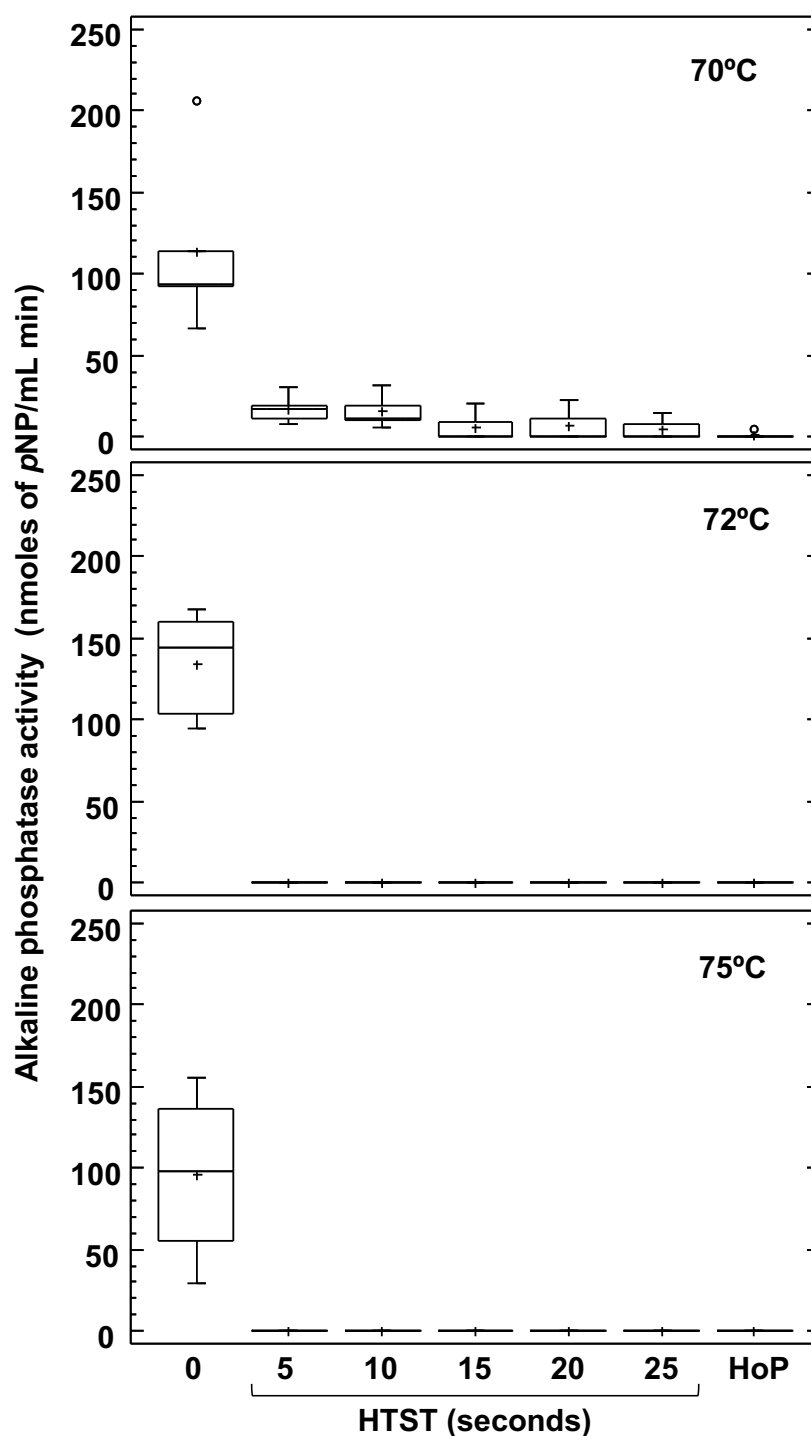
	70°C						72°C						75°C					
	L13	L17	L20	L23	L26		L16	L18	L21	L24	L28	L15	L19	L22	L25			
<b>Gram + bacteria</b>																		
<i>Bacillus</i>									B									
<i>Clostridium ramosum</i>	BM																	
<i>Corynebacterium tuberculostrictum</i>													C					
<i>Enterococcus faecalis</i>	CK	BCK	BCK	BCK	CK		BCK	BCK	BCK	BCK	CK	CK	BCK	BCK	BCK			
<i>Staphylococcus aureus</i>					C		BC	BC			C	C						
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CK	CK	BCK	CK	BC		BCK	BCK	BCK	BC	BCK	BCK	BCK	BC	C			
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>		BC		B	BK				CK					C	B			
<b>Gram - bacteria</b>																		
<i>Acinetobacter baumannii</i> complex																		
<i>Acinetobacter ursingii</i>		B					M			B	BM	B	BM	M				
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	C		BM					M	M		BM	M						
<i>Enterobacter absuriae/cloacae</i>																		
<i>Enterobacter gergoviae</i>																		
<i>Klebsiella sp.</i>									B									
<i>Klebsiella oxytoca</i>					M		M			M		B	BM		BM			
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		BM			M			BM										
<i>Pantoea agglomerans</i>							M		M	BK								
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				BM														
<i>Pseudomonas fluorescens</i>					BM			B				B						
<i>Pseudomonas putida</i>									BM				B					
<i>Serratia grimesii</i>					B													
<i>Serratia liquefaciens</i>							B											
<i>Serratia marcescens</i>		M						M										
<i>Sienotrophomonas maltophilia</i>	BM									M	B				M			
<b>Yeast</b>																		
<i>Candida parapsilosis</i>		C										C						
<i>Trichosporon asahii</i>																		
<b>Number of different species</b>	5	7	3	4	8		7	7	9	6	6	10	7	5	8			

**Figure 6.** Microbial species isolated from raw DHM batches (N=14) that were used for HTST processing at 70, 72 and 75°C. The letter inside the dark square indicates the culture media where the microorganism was isolated (B, BHI; C, CNA; K, KAA, and M, MCK agar plates).

BHI, Brain Heart Infusion; CNA, Columbia Nalidixic Acid; KAA, Kanamycin Aesculin Azide; and MCK, MacConkey.

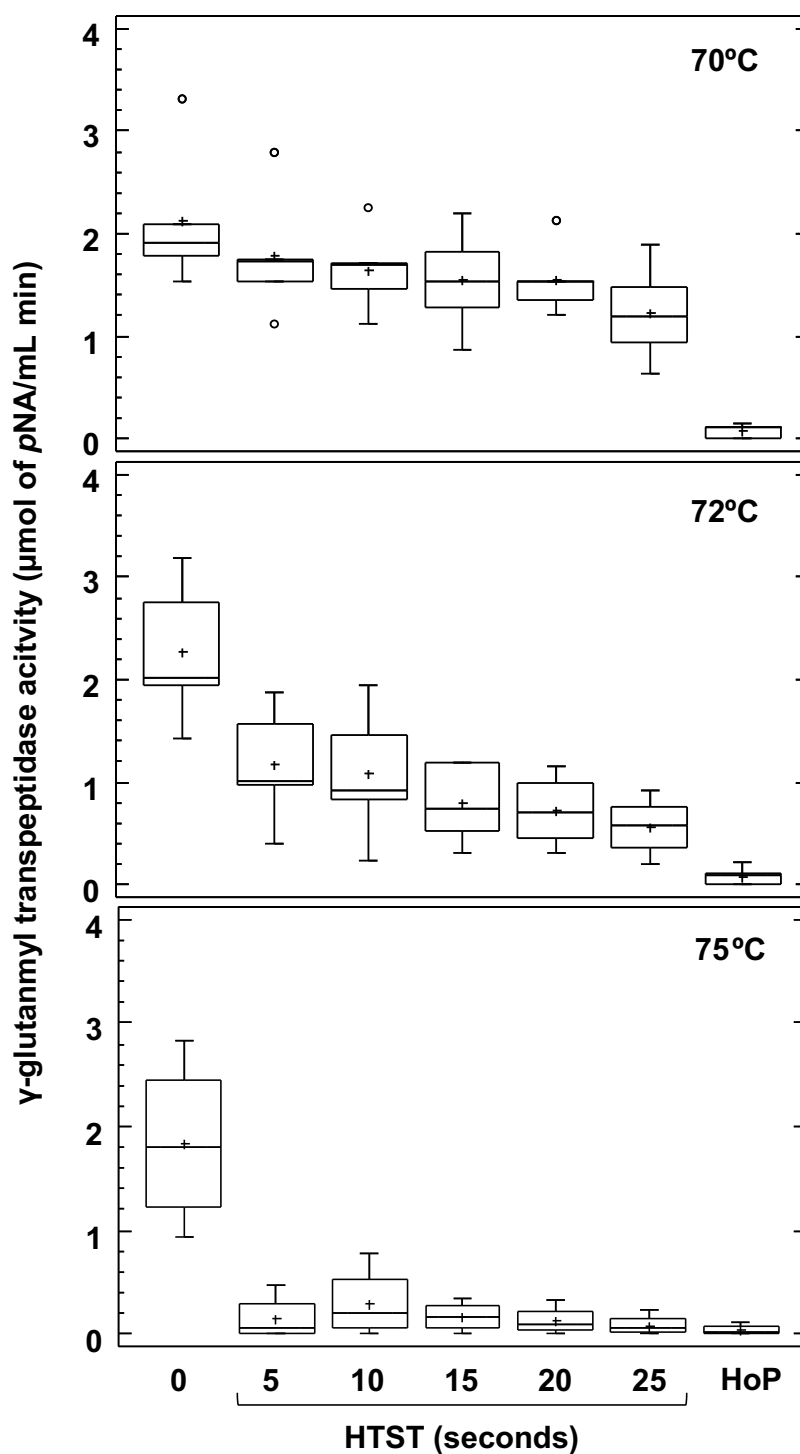


**Figure 7.** PFGE profiles of enterococci isolated from DHM production batches (N=4) before and after different heat treatments, and recovered from different culture media: B, isolate recovered from BHI (Brain Heart Infusion); C, isolate recovered from CNA (Columbia Nalidixic Acid); K, isolate recovered from KAA (Kanamycin Aesculin Azide). L13B, L13C, L13K, L23B, L23C, L23K, L24B, L24C, L24K, L26B, L26C, and L26K were isolated from raw DHM samples. L131A, L131B, L131C, L131D, L131E, L231C, L231E, L243E, and L261E were isolated from pasteurized DHM samples.



**Figure 8.** Alkaline phosphatase activity in DHM before (0) and after both HTST treatment at 70, 72 and 75°C for 5, 10, 15, 20, and 25 s and Holder pasteurization (HoP, 62.5°C, 30 min) (N=14). [The central rectangle represents the interquartile range (IQR), the line and the cross inside the rectangle shows the median and the mean, respectively, the whiskers indicate the maximum and minimum values, and the dots outside the rectangles are suspected outliers ( $>1.5$  IQR)]





**Figure 9.**  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase activity in DHM before (0) and after both HTST treatment at 70, 72 and 75°C for 5, 10, 15, 20, and 25 s and Holder pasteurization (HoP, 62.5°C, 30 min) (N=14). [The central rectangle represents the interquartile range (IQR), the line and the cross inside the rectangle shows the median and the mean, respectively, and the whiskers indicate the maximum and minimum values, the cross; the black dots outside the rectangles are suspected outliers ( $>1.5$  IQR)]

## VI. 7. TABLES

**Table 1.** Adjustment of DHM flow for each specified treatment time (at the holding section) and calculated lag time for heat-treated DHM sampling after a steady condition for each specified treatment time had been reached.

Fluid flow (L/h)	Holding time (s)	Lag time for sampling (s)
5	25	168.14
7	20	136.80
10	15	95.75
14	10	68.40
28	5	33.59

\*Lag time was calculated as the time it takes for the DHM to travel from the exit of the holding section to the sampling point at the exit of the system [Lag time = conduction length × conduction section / flow rate].

**Table 2.** Microbiological counts in raw DHM used in all heat processing trials (N=14).

Growth media	Total microbial counts <sup>a</sup>		
	Mean (95% CI)	Minimum	Maximum
BHI	4.76 (4.33 – 5.18)	3.60	5.81
CNA	4.40 (4.06 – 4.75)	3.63	5.57
KAA	3.98 (3.46 – 4.49)	2.60	5.78
MCK	3.96 (3.22 – 4.70)	1.30	5.42

<sup>a</sup>Values of total microbial counts were expressed as log<sub>10</sub> cfu/mL.

CI, confidence interval of the mean.

Growth media: BHI (Brain Heart Infusion), CNA (Columbia Nalidixic Agar), KAA (Kanamycin Aesculin Agar), and MCK (MacConkey).

**Table 3.** Correlations between total microbiological counts of raw DHM in the different culture media used for their quantification.

Growth media	CNA	KAA	MCK
<b>BHI</b>	0.705 <sup>a</sup> (0.005)	0.627 (0.017)	0.951 (0.000)
<b>CNA</b>		0.894 (0.000)	0.731 (0.003)
<b>KAA</b>			0.607 (0.021)

<sup>a</sup>Values of Pearson's correlation coefficient ( $r$ ); the statistical significance ( $p$ -value) is indicated in brackets.

Growth media: BHI (Brain Heart Infusion), CNA (Columbia Nalidixic Agar), KAA (Kanamycin Aesculin Agar), and MCK (MacConkey).

**Table 4.** Microbiological characterization of batches of raw DHM that were processed in this study (N=14).

Microorganism	n (%) <sup>b</sup>	Microbial counts <sup>a</sup>		
		Mean (95% CI)	Minimum	Maximum
Gram + bacteria				
<i>Bacillus cereus</i>	1 (7)	2.45		
<i>Clostridium ramosum</i>	1 (7)	5.25		
<i>Corynebacterium tuberculo</i> <i>tuberculo</i> <i>stearicum</i>	1 (7)	3.20		
<i>Enterococcus faecalis</i>	14 (100)	3.97 (3.50 – 4.45)	2.77	5.77
<i>Staphylococcus aureus</i>	7 (50)	3.55 (2.98 – 4.11)	2.88	4.50
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	14 (100)	4.16 (3.87 – 4.44)	3.27	4.90
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	6 (43)	3.52 (2.50 – 4.53)	1.88	4.55
Gram - bacteria				
<i>Acinetobacter baumannii</i> complex	3 (21)	3.45 (1.04 – 5.85)	2.34	4.11
<i>Acinetobacter ursingii</i>	5 (36)	3.25 (2.18 – 4.33)	2.30	4.00
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	3 (21)	3.58 (2.95 – 4.22)	3.30	3.77
<i>Enterobacter asburiae/cloacae</i>	5 (36)	2.78 (1.85 – 3.70)	1.69	3.61
<i>Enterobacter gergoviae</i>	1 (7)	2.99		
<i>Klebsiella oxytoca</i>	7 (50)	3.12 (2.34 – 3.90)	1.84	4.17
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4 (29)	2.79 (1.33 – 4.24)	1.84	4.03
<i>Pantoea agglomerans</i>	1 (7)	2.34		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3 (21)	5.10 (4.52 – 5.69)	4.92	5.37
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3 (21)	4.78 (2.70 – 6.86)	4.30	5.75
<i>Pseudomonas putida</i>	2 (14)	3.89	2.88	4.90
<i>Serratia marcescens</i>	2 (14)	3.51	3.00	4.03
<i>Serratia grimesii</i>	1 (7)	4.53		
<i>Serratia liquefaciens</i>	1 (7)	2.75		
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	4 (29)	4.18 (2.51 – 5.86)	2.77	5.30
Yeast				
<i>Candida parapsilosis</i>	3 (21)	3.38 (1.57 – 5.19)	2.69	4.14
<i>Trichosporon asahii</i>	1 (7)	1.69		

<sup>a</sup>Microbial counts were expressed as log<sub>10</sub> cfu/mL.<sup>b</sup>Number of DHM batches where microbial growth was detected.

CI, confidence interval of the mean; DHM, donor human milk; N, number of total DHM batches processed.

**Table 5.** Microbiological analysis of DHM production batches (N=14) before and after both HTST treatment at 70, 72 and 75°C for 5, 10, 15, 20, and 25 s and Holder pasteurization (62.5°C, 30 min) in several culture media (BHI, Brain Heart Infusion; CNA, Columbia Nadilixic Agar; KAA, Kanamycin Aesculin Agar; MCK, MacConkey).

Heat treatment	TC <sup>b</sup> in BHI			TC in CNA			TC in KAA			TC in MCK		
	n/N <sup>a</sup>	(mean ± SD)	n/N	(mean ± SD)	n/N	(mean ± SD)	(mean ± SD)	n/N	(mean ± SD)	n/N	(mean ± SD)	(mean ± SD)
Untreated	5/5	4.98 ± 0.94	5/5	4.31 ± 0.73	5/5	4.06 ± 0.95	4.11 ± 1.83	5/5	4.11 ± 1.83	5/5	4.11 ± 1.83	4.11 ± 1.83
HTST 70°C, 5 s	2/5	2.60 ± 0.30	2/5	2.24 ± 0.50	1/5	1.70	—	0/5	—	0/5	—	—
HTST 70°C, 10 s	2/5	2.62 ± 0.60	2/5	2.06 ± 0.83	1/5	1.47	—	0/5	—	0/5	—	—
HTST 70°C, 15 s	2/5	2.27 ± 0.03	2/5	1.83 ± 0.75	1/5	1.30	—	0/5	—	0/5	—	—
HTST 70°C, 20 s	2/5	2.04 ± 0.13	2/5	1.88 ± 0.40	0/5	—	—	0/5	—	0/5	—	—
HTST 70°C, 25 s	2/5	2.09 ± 0.07	1/5	2.30	0/5	—	—	0/5	—	0/5	—	—
Holder (62.5°C, 30 min)	1/5	2.07	0/5	— <sup>§</sup>	0/5	—	—	0/5	—	0/5	—	—
Untreated	5/5	4.92 ± 0.40	5/5	4.67 ± 0.40	5/5	4.08 ± 0.73	4.17 ± 0.89	5/5	4.17 ± 0.89	5/5	4.17 ± 0.89	4.17 ± 0.89
HTST 72°C, 5 s	2/5	2.27 ± 0.03	0/5	—	1/5	1.30	—	0/5	—	0/5	—	—
HTST 72°C, 10 s	2/5	2.40 ± 0.14	0/5	—	0/5	—	—	0/5	—	0/5	—	—
HTST 72°C, 15 s	2/5	2.41 ± 0.14	0/5	—	0/5	—	—	0/5	—	0/5	—	—
HTST 72°C, 20 s	2/5	2.54 ± 0.04	0/5	—	0/5	—	—	0/5	—	0/5	—	—
HTST 72°C, 25 s	2/5	2.56 ± 0.01	0/5	—	0/5	—	—	0/5	—	0/5	—	—
Holder (62.5°C, 30 min)	2/5	2.35 ± 0.02	0/5	—	0/5	—	—	0/5	—	0/5	—	—
Untreated	4/4	4.28 ± 0.70	4/4	4.17 ± 0.62	4/4	3.73 ± 1.17	3.50 ± 1.04	4/4	3.50 ± 1.04	4/4	3.50 ± 1.04	3.50 ± 1.04
HTST 75°C, 5 s	1/4	2.22	0/4	—	0/4	—	—	0/4	—	0/4	—	—
HTST 75°C, 10 s	1/4	2.20	0/4	—	0/4	—	—	0/4	—	0/4	—	—
HTST 75°C, 15 s	1/4	1.95	0/4	—	0/4	—	—	0/4	—	0/4	—	—
HTST 75°C, 20 s	1/4	2.05	0/4	—	0/4	—	—	0/4	—	0/4	—	—
HTST 75°C, 25 s	1/4	2.12	0/4	—	0/4	—	—	0/4	—	0/4	—	—
Holder (62.5°C, 30 min)	1/4	2.22	0/4	—	0/4	—	—	0/4	—	0/4	—	—

<sup>a</sup>n/N, number of DHM batches where microbial growth was detected (n) in the total batches processed at that temperature (N).

<sup>b</sup>TC, total microbiological counts (log<sub>10</sub> cfu/mL). A description of the microbial diversity in samples can be found in Figure 6 and Table 5.

<sup>§</sup>Below the detection limit of the method (<20 cfu/mL).

**Table 6.** Bacterial identification of survivors recovered after HTST treatment at 70, 72 and 75°C for 5 to 25 s and Holder pasteurization (62.5°C for 30 min) of DHM batches (N=14).

Heat treatment	n/N <sup>a</sup>	Microorganism	Growth medium
HTST 70°C, 5 s	1/5	<i>Bacillus cereus</i>	BHI
	2/5	<i>Enterococcus faecalis</i>	BHI, CNA, KAA
HTST 70°C, 10 s	1/5	<i>Bacillus cereus</i>	BHI
	1/5	<i>Enterococcus faecalis</i>	BHI, CNA, KAA
HTST 70°C, 15 s	2/5	<i>Bacillus cereus</i>	BHI
	2/5	<i>Enterococcus faecalis</i>	BHI, CNA, KAA
HTST 70°C, 20 s	1/5	<i>Bacillus cereus</i>	BHI
	1/5	<i>Enterococcus faecalis</i>	BHI, CNA
HTST 70°C, 25 s	1/5	<i>Bacillus cereus</i>	BHI
	1/5	<i>Enterococcus faecalis</i>	BHI, CNA
HTST 72°C, 5 s	2/5	<i>Bacillus cereus</i>	BHI
	1/5	<i>Enterococcus faecalis</i>	KAA
HTST 72°C, 10 s	2/5	<i>Bacillus cereus</i>	BHI
HTST 72°C, 15 s	2/5	<i>Bacillus cereus</i>	BHI
HTST 72°C, 20 s	2/5	<i>Bacillus cereus</i>	BHI
HTST 72°C, 25 s	2/5	<i>Bacillus cereus</i>	BHI
HTST 75°C, 5 s	1/4	<i>Bacillus cereus</i>	BHI
HTST 75°C, 10 s	1/4	<i>Bacillus cereus</i>	BHI
HTST 75°C, 15 s	1/4	<i>Bacillus cereus</i>	BHI
HTST 75°C, 20 s	1/4	<i>Bacillus cereus</i>	BHI
HTST 75°C, 25 s	1/4	<i>Bacillus cereus</i>	BHI
Holder (62.5°C, 30 min)	4/14	<i>Bacillus cereus</i>	BHI

<sup>a</sup>n, number of batches positive for bacterial growth; N, total number of batches processed.

Growth media where the isolates were recovered: BHI (Brain Heart Infusion), CNA (Columbia Nalidixic Agar), KAA (Kanamycin Aesculin Agar).

**Table 7.** Inactivation of alkaline phosphatase and  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase in DHM after HTST treatment at 70 to 75°C for 5 to 25 s and Holder pasteurization (62.5°C, 30 min).

		Alkaline phosphatase (% of inactivation) <sup>a</sup>		$\gamma$ -glutamyl transpeptidase (% of inactivation) <sup>b</sup>	
		Mean (95% CI)	<i>p</i> -value <sup>c</sup>	Mean (95% CI)	<i>p</i> -value
HTST 70°C, 5 s	5	85 (82 – 88)	0.0001	16 (10 – 23)	0.000
HTST 70°C, 10 s	5	87 (84 – 90)		21 (15 – 28)	
HTST 70°C, 15 s	5	96 (94 – 99)		27 (20 – 34)	
HTST 70°C, 20 s	5	96 (93 – 99)		25 (18 – 32)	
HTST 70°C, 25 s	5	97 (94 – 100)		43 (36 – 50)	
Holder (62.5°C, 30 min)	5	99 (96 – 102)		97 (90 – 103)	
HTST 72°C, 5 s	5	100	-	51 (44 – 58)	0.000
HTST 72°C, 10 s	5	100		54 (46 – 61)	
HTST 72°C, 15 s	5	100		67 (60 – 74)	
HTST 72°C, 20 s	5	100		70 (62 – 77)	
HTST 72°C, 25 s	5	100		76 (69 – 84)	
Holder (62.5°C, 30 min)	5	100		97 (90 – 104)	
HTST 75°C, 5 s	4	100	-	94 (89 – 99)	0.348
HTST 75°C, 10 s	4	100		88 (83 – 93)	
HTST 75°C, 15 s	4	100		93 (88 – 98)	
HTST 75°C, 20 s	4	100		95 (90 – 100)	
HTST 75°C, 25 s	4	100		97 (92 – 101)	
Holder (62.5°C, 30 min)	4	100		98 (93 – 103)	

<sup>a</sup>The alkaline phosphatase activity in unheated DHM samples (n=14) had a mean (95% CI) value of 115.96 (89.20-142.72) nmoles of *p*NP/mL min.

<sup>b</sup>The  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase activity in unheated DHM samples (n=14) had a mean (95% CI) value of 2.09 (1.70-2.50)  $\mu$ mol of *p*NA/mL min.

<sup>c</sup>One-way ANOVA to compare the inactivation of the enzyme (ALP or GGTP) in DHM after HTST treatment at different holding times and Holder pasteurization.

CI, confidence interval of the mean.

**Table 8.** Effect of HTST treatment at 70, 72 and 75°C for 5, 10, 15, 20 and 25 s and Holder pasteurization (62.5°C, 30 min) on the furosine concentration in DHM samples.

	n	Furosine (mg/100 g of protein)				p-value
		Mean $\pm$ SD	95% CI	Min	Max	
Untreated	10	2.1 $\pm$ 0.3	1.8 – 2.3	1.3	2.5	0.000 <sup>†</sup>
Holder (62.5°C, 30 min)	10	4.7 $\pm$ 1.2	3.8 – 5.5	2.6	6.1	
Untreated	3	1.9 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	1.3 – 2.4	1.3	2.3	0.001 <sup>††</sup>
HTST 70°C, 5 s	3	2.6 $\pm$ 0.3 <sup>ab</sup>	2.0 – 3.1	2.3	2.8	
HTST 70°C, 10 s	3	2.8 $\pm$ 0.3 <sup>ab</sup>	2.2 – 3.3	2.6	3.1	
HTST 70°C, 15 s	3	3.1 $\pm$ 0.5 <sup>abc</sup>	2.6 – 3.7	2.6	3.4	
HTST 70°C, 20 s	3	3.3 $\pm$ 0.6 <sup>abc</sup>	2.8 – 3.8	2.6	4.1	
HTST 70°C, 25 s	3	3.6 $\pm$ 0.6 <sup>bc</sup>	3.0 – 4.1	3.2	4.3	
Holder (62.5°C, 30 min)	3	4.5 $\pm$ 1.2 <sup>c</sup>	4.1 – 5.0	3.8	1.1	
Untreated	4	2.0 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	1.7 – 2.4	1.8	2.3	0.001 <sup>††</sup>
HTST 72°C, 5 s	4	3.1 $\pm$ 0.3 <sup>ab</sup>	2.7 – 3.5	2.8	3.5	
HTST 72°C, 10 s	3	3.0 $\pm$ 0.4 <sup>ab</sup>	2.6 – 3.5	2.6	3.4	
HTST 72°C, 15 s	4	3.4 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	2.9 – 3.8	2.9	4.1	
HTST 72°C, 20 s	4	3.2 $\pm$ 0.4 <sup>ab</sup>	2.8 – 3.6	2.7	3.5	
HTST 72°C, 25 s	4	3.3 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	2.9 – 3.7	2.7	3.9	
Holder (62.5°C, 30 min)	4	5.2 $\pm$ 0.9 <sup>c</sup>	4.8 – 5.6	4.4	6.1	
Untreated	3	2.3 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	1.8 – 2.8	2.2	2.5	0.011 <sup>††</sup>
HTST 75°C, 5 s	3	3.3 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	2.8 – 3.9	2.9	3.6	
HTST 75°C, 10 s	3	3.0 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	2.4 – 3.5	2.6	3.3	
HTST 75°C, 15 s	3	3.2 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	2.7 – 3.7	2.9	3.4	
HTST 75°C, 20 s	3	3.0 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	2.5 – 3.5	2.8	3.1	
HTST 75°C, 25 s	3	3.7 $\pm$ 0.8 <sup>ab</sup>	3.1 – 4.2	3.1	4.6	
Holder (62.5°C, 30 min)	3	5.0 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>	4.5 – 5.6	3.8	5.8	

<sup>†</sup>Paired student t-test to compare furosine concentration in raw and Holder pasteurized DHM.

<sup>††</sup>One-way ANOVA to compare furosine concentration in untreated (raw) DHM and after HTST treatment at different holding times and Holder pasteurization. Superscript letters on mean  $\pm$  SD values indicate statistical differences when Tukey's *post hoc* pairwise comparison test was done.

SD, standard deviation; CI, confidence interval.





**VII. EFECTO DE LA PASTEURIZACIÓN HTST Y HOLDER EN LAS  
INMUNOGLOBULINAS, FACTORES DE CRECIMIENTO  
Y HORMONAS PRESENTES EN LA LECHE DONADA**

---

**EFFECT OF HTST AND HOLDER PASTEURIZATION ON  
IMMUNOGLOBULINS, GROWTH FACTORS AND  
HORMONES PRESENT IN DONOR MILK**

*Manuscrito en preparación*



## VII. 1. INTRODUCTION

Mother's own milk is the gold standard for the feeding of newborn infants. It provides not only the macronutrients and micronutrients that fulfill the requirements of the newborn but also a myriad of bioactive compounds, such as immunoglobulins (Igs), cytokines, growth factors (GFs) and hormones (Field *et al.*, 2005; Gregory and Walker, 2016; Lewis *et al.*, 2016; Oddy *et al.*, 2010). In fact, human milk and colostrum are often regarded as the most important sources of natural bioactive compounds, which are associated to a wide variety of physiological functions in the breastfeeding infant. Protection against infections, contribution to the establishment of an efficient gut barrier and training of the infant immune system are among these functions, favoring the development of intestinal and systemic immune-homeostasis (Kainonen *et al.*, 2013). In particular, the delivery of such immune compounds and GFs into the rapidly developing infant gut may prevent serious adverse outcomes, including necrotizing enterocolitis (NEC) and long term cardiovascular risk, particularly in preterm or very low birth weight infants (Lewandowski *et al.*, 2016; Quigley and McGuire, 2014). Moreover, the protection that breastfeeding confers against faster weight gain and, consequently, against later obesity appears to be associated to the presence of hormones involved in food intake regulation and energy balance in milk (Savino *et al.*, 2009).

All these bioactive compounds present in human milk are absent in infant formula in spite their composition provides the requirements for energy and for nutrients in order to support a rapid growth rate based on available scientific evidence (EFSA NDA Panel, 2014). Therefore, when mother's own milk is unavailable, or is in short supply to meet the nutritional requirements of the preterm infant, the next best alternative is donor human milk (DHM) (AAP, 2012; ESPGHAN *et al.*, 2013).

DHM is usually pasteurized to ensure its microbiological safety and, currently, Holder pasteurization (HoP) is the most common method being applied in human milk banks (HMB). This method, which involves heating DHM at 62.5°C for at least 30 min, destroys high-risk viruses and non-spore-forming pathogenic bacteria (Landers and Updegrave, 2010). Unfortunately, HoP affects, at higher or lower degree, some bioactive compounds present in human milk. In particular, HoP reduces Igs of all classes, probably due to their complex and delicate structure, which is crucial to carry out their specific biological functions (Peila *et al.*, 2016). Among Igs, IgA is the most abundant in human milk and, therefore, has been the most extensively studied regarding the effect of heat treatment on their activity, which is reduced by 20-60% after HoP (Czank *et al.*, 2009; O'Connor *et al.*, 2015; Peila *et al.*, 2016; Picaud and Buffin, 2017). Other classes of Igs, such as IgGs and IgM, have been examined in less detail although their levels also seem to decrease after HoP (Peila *et al.*, 2016). On the other hand, some GFs, such as epidermal growth factor (EGF) or transforming growth

factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), can withstand the conditions of HoP. However, the low number of studies and the remarkable variability in structure between the different GFs do not allow to draw a clear conclusion about their sensitivity to heat treatments (Espinosa-Martos *et al.*, 2013; Goelz *et al.*, 2009; McPherson and Wagner, 2001; Peila *et al.*, 2016; Reeves *et al.*, 2013; Untalan *et al.*, 2009). Furthermore, although the physiological effects of hormones depend mostly on their concentration, few studies have evaluated the variation in the content of hormones in human milk after pasteurization. A decrease in the concentration of adiponectin present in human milk has been reported after HoP but, in contrast, leptin concentration was not modified by the same treatment (Peila *et al.* 2016). Nevertheless, again, the scarcity of available reports does not allow any conclusion.

Alternative methods for DHM treatment are been investigated in order to ensure the target microbial inactivation, while improving the preservation of its bioactive components (Peila *et al.*, 2017). Among all the methods available at the moment, high-temperature short-time (HTST) treatment seems to better retain IgA and antioxidant capacity as well as bile salt-stimulated lipase, lactoferrin and lysozyme activities in DHM (Baro *et al.*, 2011; Giribaldi *et al.*, 2016; Silvestre *et al.*, 2008). However, all these studies involved a low number of samples or the use of experimental systems for HTST pasteurization that have never been tested for usage under real conditions in HMB. In this context, a continuous HTST system to pasteurize DHM in the HMB operating environment has been designed and validated recently (Escuder, 2017a).

Therefore, the objective of this work was to compare the effect of HTST treatment at different temperature/time pairs in relation to HoP on the main Igs, GFs and hormones found in DHM.

## VII. 2. MATERIAL AND METHODS

### VII. 2. 1. Human milk samples

Donor human milk (DHM) samples were obtained from the HMB located at the Hospital 12 de Octubre in Madrid (Spain). Milk collection was performed following a specific protocol for donor mothers approved by the local ethics committee and informed consent was obtained from each donor. Milk samples collected from multiple donors (~12 donors per batch) were mixed to compose each one of 18 production batches (10 L volumen each). A 111 mL aliquot of pooled raw milk was kept to be used as control and another 120-mL aliquot was transferred to a 150-mL glass bottle and subjected to HoP following the regular procedure of the HMB. The rest of the product was HTST processed at the temperatures (70, 72 and 75°C) and times (5 to 25 seconds) described previously (Escuder, 2017a). Aliquots of raw and pasteurized DHM were stored frozen at -20°C until analysis. To avoid interferences in immunoassays, the fatty layer was removed from samples by centrifugation at 14,000 ×g for 10 minutes at 4°C.

### VII. 2. 2. Analysis of Igs, GFs and hormones in the milk samples

Concentrations of Igs (IgA, IgG, and IgM), TGF- $\beta_2$  and hormones (adiponectin, ghrelin, and leptin) were determined in duplicate using a Bioplex 200 system instrument (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and the Bio-Plex Pro Human Isotyping Assay, Bio-Plex Pro Human TGF- $\beta$  Assay and Bio-Plex Pro Human Diabetes Assays kits (Bio-Rad). The concentration of EGF was measured using the RayBio<sup>®</sup> Human EGF ELISA kit (RayBiotech, Norcross, GA). Every assay was performed according to manufacturer's instructions and standard curves were performed for each analyte. The analytes were assayed in at least three batches for each treatment.

### VII. 2. 3. Statistical analysis

Normality of data distribution was tested through histograms and Saphiro-Wilks tests. Non-parametric statistical analyses were selected accordingly to the non-normal distribution of all the variables. Results are displayed as the median and interquartile range (IQR). The effect of HTST treatments and HoP on Igs, GFs and hormones concentration was expressed as the retention rate in relation to raw DHM samples. Kruskal-Wallis test was used to compare the effect of HTST treatments and HoP on the percentage of retained Igs, GFs and hormones in DHM samples. Pairwise *post-hoc* multiple comparisons with the Bonferroni correction were used to identify which treatments were significantly different. The effect of different temperatures and times used for HTST treatments of DHM batches was evaluated using generalized linear models (GLM's) and multifactorial analysis of variance (MANOVA). Significance was set at  $p < 0.05$ . Statgraphics Centurion XVI version 16.1.15 (Statpoint Technologies Inc., Warrenton, VA) and R 3.3.2 (R-project, <http://www.r-project.org>)

statistical software packages were used to perform these analyses.

## VII. 3. RESULTS

### VII. 3. 1. Igs, GFs and hormones in raw DHM

All Igs (IgA, IgM, and IgG), GFs (TGF- $\beta_2$  and EGF) and hormones (adiponectin, ghrelin, and leptin) analyzed in this work were detected in all the batches of raw DHM and showed a wide range of concentrations (Table 1). Igs were the most abundant of the bioactive compounds analyzed, being found at concentrations of up to 905.02 mg/L, while GFs and adiponectin were present at relatively moderate concentrations (in the  $\mu\text{g/L}$  range) and hormones ghrelin and leptin had the lowest levels (in the  $\mu\text{g/L}$  to ng/L range). Median concentration of IgA (473.32 mg/L) was approximately 20-fold higher than that of IgG and IgM in raw DHM batches (17.99 and 18.79 mg/L, respectively). EGF and TGF- $\beta_2$  were found in amounts ranging from 3.14 to 4.02  $\mu\text{g/L}$  and from 1.16 to 3.75  $\mu\text{g/L}$ , respectively. Among hormones, adiponectin was the most abundant (7.74  $\mu\text{g/L}$ ) when compared with leptin and ghrelin (116.97 and 25.53 ng/L, respectively).

The wide variation in the concentration of these bioactive compounds observed among raw DHM batches is clearly reflected in the broad calculated IQR for Igs and hormones, while the concentration of GFs seemed to be narrower (Table 1, Figures 1-3). For this reason, and in order to normalize the data, the effect of heat treatments on each compound was expressed as the percentage of the concentration retained after the heat treatment in relation to the concentration present in raw DHM samples, instead of as the direct concentration in the heat-treated sample.

### VII. 3. 2. Effect of HTST treatments and HoP on bioactive compounds in DHM

The percentages of the Ig concentration that was retained in the DHM samples after the different HTST treatments and HoP are shown in Figure 4 and Table 2. IgG showed the highest retention of activity (87–101%) after HTST treatments, followed by IgA (54–88%), while IgM had the lowest values (25–73%). In all cases, the level of retained Ig after HTST treatments at 70, 72 and 75°C for 5-25 seconds was statistically significant higher than those obtained after HoP ( $p < 0.05$ ), except for IgA after HTST treatment at 70°C ( $p = 0.102$ ) and IgG after HTST treatment at 75°C ( $p = 0.074$ ). In addition, IgA and IgG retention values showed no differences among HTST treatments at different temperatures and times. In contrast, IgM retention rates were higher when lower temperatures and times were used ( $p < 0.001$ ). This fact was also reflected in the pairwise multiple comparison analysis (Table 2).

Regarding GFs, the retention values for TGF- $\beta_2$  activity were higher after HTST treatment at 70, 72 and 75°C for 5-25 seconds (78–107%) compared to levels found after HoP (52–70%), although these differences were not statistically significant ( $p = 0.176$ ,  $p = 0.480$  and  $p = 0.088$ , respectively) (Figure 5, Table 3).



Destruction of EGF was only studied in DHM samples after HTST treatment at 72°C for 5-25 seconds or HoP, and none of the heat treatments had a substantial effect on its concentration ( $p=0.956$ ) (Table 3, Figure 5).

DHM adiponectin and ghrelin concentrations were unaffected after the different HTST treatments and HoP (Figure 6, Table 4). In contrast, leptin was not detected after HoP, whereas the retention rates of this hormone oscillated between 34–68% after the different HTST treatments (Table 4).

## VII. 4. DISCUSSION

In this work, the effect of HMB-operative HTST treatments on the concentration of some milk bioactive factors, including Igs, GFs and hormones, was assessed and compared to that exerted by the traditional HoP method. Globally, HTST treatments were associated to a significantly higher preservation of, at least, some of the tested biologically active compounds.

The immature infant is exposed to a wide and challenging spectrum of microorganisms and allergens in early life. During this crucial period of host vulnerability, human milk provides a high number of bioactive factors with immunological, anti-inflammatory and anti-infectious properties (Ballard and Morrow, 2013). Some of them supplement the immune protection at the mucosal level while others are immune modulating or growth stimulating, contributing to the correct development of the infant's mucosal barriers and immune system (Kainonen *et al.*, 2013; Lawrence and Pane, 2007; M'Raber *et al.*, 2008; Turfkruyer and Verhasselt, 2015; Verhasselt, 2010). Globally, such plethora of biologically active compounds seem to be responsible for the unparalleled long-lasting protection that human milk confers to infants against a wide array of diseases in both developed and developing countries (Binns *et al.*, 2016; Lodge *et al.*, 2015; U.S. Department of Health and Human Services, 2011). Therefore, the lactating mammary gland can be truly considered as a relevant part of the infant immune system where colostrum and milk provides the postnatal link that promotes maternal-infant immune dialogue (Bourges *et al.*, 2008; Brandtzaeg, 2010). Immune-protection and immune programming conferred by human milk while the neonate matures and adapts to the extra-uterine environment is especially relevant in premature infants (Gregory and Walker, 2013) because they have a lower number of immune cells, a lower functional capacity and a dysregulated inflammatory response when compared to term infants (Lewis *et al.*, 2017).

Infant protection against infectious diseases provided by milk greatly relies on the passive transfer of high amounts of microbe-specific Igs that compensate for the deficiency of Ig synthesis during the first year of life (Hill and Newburg, 2015). In addition, human milk antibodies promote long-term intestinal homeostasis by regulating the gut microbiota and host gene expression (Rogier *et al.*, 2014). These actions and effects are possible because Igs are quite resistant to infant gastric digestion and their glycosylation may further reduce their digestibility and preserve the antigen-binding motif required for activity (Zhang *et al.*, 2014).

Secretory IgA (SIgA) is the predominant Ig class found in human milk and its role in the prevention of respiratory and gastrointestinal infectious diseases in breast-fed infants is well documented (Brandtzaeg, 2003). In addition, SIgAs play a relevant role in the regulation of the immune response to dietary antigens and, in fact, epidemiological studies have reported an inverse relation between the levels of

maternal milk sIgAs and the development of allergy (Jarvinen *et al.*, 2000; Savilahti *et al.*, 2005). It must be highlighted that both the amount and repertoire of IgAs directly produced by infants are clearly deficient because antigen-exposed memory cells have not been generated yet while transplacental transfer of IgAs is very low in the human species, particularly in comparison to that of IgGs. This situation is aggravated in preterm neonates because their earlier exposure to foreign microbes and antigens (in relation to their lower gestational age) does not accelerate the expression of the gene pool involved in IgA production (Zasada *et al.*, 2014).

IgMs are also relevant for neonatal health playing an important role in the opsonization of Gram-negative pathogens (Brandtzaeg and Johansen, 2007; Lawrence and Pane, 2007). Similarly to IgAs, IgGs produced by infants are not enough for proper homeostasis during early life. IgG transplacental transfer only partially corrects this deficiency since passively acquired IgGs decrease rapidly after birth, making infants particularly sensitive to encapsulated organisms (Lawrence and Pane, 2007). All these facts reinforce the value of human milk for neonates, and, particularly for those born preterm.

The levels of Igs in human milk are very variable depending, among other factors, on the stage of lactation, decreasing rapidly in the first four weeks post-partum (Weaver *et al.*, 1998). The variability of the IgA content among the DHM samples analyzed in this study (381.51–694.43 mg/L) is similar to that reported for mature milk (247–488 µg/mL) by other authors (Agarwal *et al.*, 2011; Permanyer *et al.* 2010). The advantage of HTST over HoP for the preservation of IgA shown in this study has been widely acknowledged previously (Dhar *et al.*, 1996; Giribaldi *et al.*, 2016; Goldblum *et al.*, 1984; Hamprecht *et al.*, 2004). In contrast, the effect of HTST treatments on other Ig classes, such as IgG or IgM, has not been previously evaluated and this work also showed the statistically significant advantage of HTST over HoP in relation to the preservation of these two Ig classes. Previous studies indicated that IgMs and IgGs are highly and moderate sensitive, respectively, to HoP (Contador, 2013; Espinosa-Martos *et al.*, 2013; Evans, 1978; Ford, 1977; Liebhaber, 1977).

A varying degree of Ig inactivation was observed among the samples analyzed in this study when they were submitted to the same heat treatment; this fact may be related to the different Ig concentrations that each sample had before treatment since protein denaturation is a concentration-dependent process (Weber and Drickamer, 1983). This result is in agreement with those provided by previous studies showing very variable Ig-retained levels in DHM samples after HoP (Peila *et al.*, 2016).

Human milk is rich in GFs, including TGF- $\beta_2$  and EGF. Presence of high concentrations of TGF- $\beta_2$  is a common feature of human milk under physiological conditions (Verhasselt, 2010). TGF- $\beta$  is considered as a key immunomodulatory factor in human milk (Smith *et al.*, 2000; Veldhoen *et al.*, 2006) and its importance is

highlighted by the fact that endogenous gut TGF- $\beta$  synthesis is defective in the neonate (Penttila *et al.*, 1998). This key modulatory factor confers protection against wheeze and atopic dermatitis in breastfed children (Kalliomaki *et al.*, 1999; Oddy *et al.*, 2003) and plays a critical role for oral tolerance induction and the global regulation of intestinal immune responses after food ingestion (Faria and Weiner, 2006; Penttila, 2010). In addition, TGF- $\beta_2$  specifically attenuates IL-1 $\beta$ -induced inflammatory responses and, through interaction with endotoxin, regulates homeostasis via IL8 levels in the immature intestine (Nguyen *et al.*, 2014; Rautava *et al.*, 2011). EGF present in human milk has a protective effect against severe neonatal intestinal diseases, such as NEC (Nair *et al.*, 2008) due to its well-known role in altering the balance of pro-apoptotic and anti-apoptotic proteins (Clark *et al.*, 2005). NEC is generally associated to preterm infants and, therefore, its prevention is of paramount importance for NICUs and HMBs. Additionally, EGF enhances proliferation and differentiation of epithelial cells in the gastrointestinal tract (Dvorak, 2010), has significant effects on the healing of damaged mucosa after injury (Jones *et al.*, 1999; Warner and Warner, 2005), and may contribute for the increased size of thymus in breastfed infants (Hasselbalch *et al.*, 1996).

TGF- $\beta_2$  retention rates after HoP of DHM samples were generally lower than those obtained after any HTST treatment (70, 72, and 75°C for 5 to 25 s), although the high variation in retention rates observed among treatments resulted in non-significant differences ( $p>0.05$ ). This high variation and, in some cases, the increase of the relative TGF- $\beta_2$  concentration after heat treatment were probably due to either TGF- $\beta_2$  release from milk cells during freeze storage (McPherson and Wagner, 2001) or to the partial heat activation that occurs between 1 to 10 minutes at 60 to 100°C (Brown *et al.*, 1990). Since the structure of the active TGF- $\beta_2$  form is highly hydrophobic, measured concentrations were related to the molecules retained in the aqueous phase of the treated samples. Globally, they were higher at lower HTST temperatures and diminished as temperature and/or time increased, which is in agreement with previous findings (McPherson and Wagner, 2001).

EGF retention rates did not change significantly during either HoP or any HTST treatment. Its unusual thermal stability has been previously reported (Espinosa-Martos *et al.*, 2013; Goelz *et al.*, 2009), and may be related to the disulfide bonding patterns that determine a high conformational stability of the tertiary structure (Chang and Li, 2002). This high stability ensures the resistance of this GF to the conditions that it may face during its transit through the infant gastrointestinal tract and may explain, at least partly, the preventive role of DHM against NEC (Good *et al.*, 2015).

The presence of hormones and GFs in human milk has been linked to the function of the mammary gland as an extra-uterine extension or replacer of the placenta to help the correct growth and development of the newborn (Grosvenor *et al.*, 1993). Milk hormones would regulate the activities of various tissues and organs of the

lactating infant until the maturation and full function of his own endocrine system. The identification in milk of hormones such as leptin, ghrelin and adiponectin, involved in the regulation of energy balance and metabolic development of the neonates, has received considerable attention in the context of the current metabolic syndrome and obesity epidemics and, also, in HMBs (Çatlı *et al.*, 2014; Demmelmair and Koletzko, 2017; Savino *et al.*, 2010). Specific receptors for such hormones have been identified in the gastrointestinal mucosa, suggesting a role of these hormones in stimulating growth and development of the gastrointestinal tract (Bielicki *et al.*, 2004). Therefore, it is not strange that breastfeeding has been associated to protection against faster weight gain and, consequently, later obesity (Kierson *et al.*, 2006). Besides hormone content in human milk, breastfeeding may influence the risk of later obesity due to its contribution to the development of infant gut microbiome and taste preferences (Woo and Martin, 2015).

Leptin, which displays an anorexigenic (or appetite-suppressing) effect, influence both short- and long-term regulation of energy balance and food intake. This hormone can be transferred from blood to milk by mammary epithelial cells or produced in the mammary gland, before being secreted by epithelial cells in milk fat globules during lactation (Bonnet *et al.*, 2002; Savino *et al.*, 2016). In fact, leptin levels in whole milk are 2 to 66 fold higher than in skimmed samples of human milk (Savino *et al.*, 2009). It is the human milk component most associated to maternal body mass index (BMI) (Savino *et al.*, 2016). Human milk leptin correlates positively with infant serum leptin, and the later does with infant BMI and weight (Savino *et al.*, 2016). The presence of leptin receptors in the gut epithelial cells suggests that it could pass from milk to infant blood, regulating satiety in the critical neonatal window (Barrenetxe *et al.*, 2002).

Adiponectin displays the opposite action to leptin, having an appetite-stimulatory effect and regulating energy metabolism. This hormone displays the highest concentration in human milk among appetite hormones, and this concentration is reduced over the course of lactation (Gridneva *et al.*, 2016; Newburg *et al.*, 2010). Survival after digestion, also related to high glycosylation, and presence of adiponectin receptors in the infant gut favor its bioavailability (Newburg *et al.*, 2010). Structure of human milk adiponectin corresponds to the 18mer, the highest oligomeric form, which is associated with the highest activity in relation to the control of many metabolic processes (Woo *et al.*, 2009). The adiponectin concentration in human milk is related to serum adiponectin and, inversely, to adiposity in breastfeed infants over the first 6 months of life, suggesting a role in early regulation of neonatal infant weight gain (Newburg *et al.*, 2010). An additional role in the attenuation of inflammatory processes of the intestinal mucosa in breastfeeding infants has been also suggested (Newburg *et al.*, 2010).

Ghrelin is also an appetite-stimulating hormone present in human milk. There is evidence of mammary gland synthesis while the contribution of transport from the blood to the milk by mammary epithelial cells is uncertain (Bonnet *et al.*, 2002; Kiersen *et al.*, 2006). This hormone is involved in the short-term regulation of feeding and in the long-term regulation of weight and energy metabolism (Çatlı *et al.*, 2014). Ghrelin levels in human milk increase progressively from birth through, at least, 6 months postpartum although current evidences linking its milk concentration and specific infant outcomes are scarce (Fields *et al.*, 2016). This 28-amino acid hormone is *n*-octanoylated and this modification (which is essential for its activity) determines high affinity for membranes, explaining why ghrelin levels are higher in whole milk than in skimmed milk (Kiersen *et al.*, 2006, Kojima and Kangawa, 2005). Therefore, it is possible that ghrelin levels detected in milk samples after the defatting centrifugation step are actually lower than those present in whole milk, as it is consumed by the infants.

Leptin was highly affected by heat treatment: it could not be detected in any DHM sample after HoP and its retention percentages after HTST treatments were the lowest among the hormones studied in this work. In contrast, ghrelin and adiponectin not only were not destroyed by any applied heat treatment but, their concentrations increased after both HoP and HTST treatments. This finding may be attributable to adiponectin dissociation from trimeric to monomeric forms (Woo *et al.*, 2009) and/or to cell membrane disruption of epithelial cells present in DHM after heat treatment, favoring the release of these hormones. Conflicting results regarding the impact of DHM pasteurization on hormone concentrations have been reported, ranging from reduced levels of adiponectin and insulin (Ley *et al.*, 2011) to no differences on leptin concentration after HoP (Chang *et al.*, 2013). The biological significance of changes in appetite hormone levels during early life is uncertain. This current lack of understanding is due to difficulties to randomize infants to different treatments. Furthermore, the high number of maternal or infant factors that influence the levels of bioactive compounds in human milk and their functions once in the infant gut determines the difficulties in relating unequivocally the variation of one compound to a specific infant outcome (Ehrenthal *et al.*, 2016; Fields *et al.*, 2016).



## VII. 5. REFERENCES

- Agarwal S, Karmaus W, Davis S, Gangur V. Immune markers in breast milk and fetal and maternal body fluids: a systematic review of perinatal concentrations. *J Hum Lact.* 2011 27:171–86.
- AAP (American Academy of Pediatrics). Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics.* 2012; 129:600–3.
- Ballard O, Morrow AL. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatr Clin North Am.* 2013; 60:49–74.
- Baro C, Giribaldi M, Arslanoglu S, Giuffrida MG, Dellavalle G, et al. Effect of two pasteurization methods on the protein content of human milk. *Front Biosci (Elite Ed).* 2011; 3:818–29.
- Barrenetxe J, Villaro AC, Guembe L, Pascual I, Muñoz-Navas, et al. Distribution of the long leptin receptor isoform in brush border, basolateral membrane, and cytoplasm of enterocytes. *Gut.* 2002; 50:797–802.
- Bielicki J, Huch R, von Mandach U. Time-course of leptin levels in term and preterm human milk. *Eur J Endocrinol.* 2004; 151:271–6.
- Binns C, Lee M, Low WY. The long-term public health benefits of breastfeeding. *Asia Pac J Public Health.* 2016; 28:7–14.
- Bonnet M, Delavaud C, Laud K, Gourdou I, Leroux C, et al. Mammary leptin synthesis, milk leptin and their putative physiological roles. *Reprod Nutr Dev.* 2002; 42:399–413.
- Bourges D, Meurens F, Berri M, Chevaleyre C, Zanello G, et al. New insights into the dual recruitment of IgA+ B cells in the developing mammary gland. *Mol Immunol.* 2008; 45:3354–62.
- Brandtzaeg P, Johansen F-E. IgA and intestinal homeostasis. In: Kaetzel CS, editor. *Mucosal Immune Defense: Immunoglobulin A.* New York: Springer Science + Business Media, LLC; 2007. p. 221–68.
- Brandtzaeg P. Mucosal immunity: integration between mother and the breast-fed infant. *Vaccine.* 2003; 21:3382–8.
- Brandtzaeg P. The mucosal immune system and its integration with the mammaryglands. *J Pediatr.* 2010; 156:S8–15.
- Brown PD, Wakefield LM, Levinsoz AD, Sporn MB. Physicochemical activation of recombinant latent transforming growth factor-beta's 1, 2, and 3. *Growth Factors* 1990; 3:35–43.
- Çatlı G, Olgaç Dünder N, Dünder BN. Adipokines in breast milk: an update. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2014; 6:192–201.



- Chang J-Y, Li L. The disulfide structure of denatured epidermal growth factor: preparation of scrambled disulfide isomers. *J Prot Chem*. 2002; 2:203–13.
- Chang JC, Chen CH, Fang LJ, Tsai CR, Chang YC, et al. Influence of prolonged storage process, pasteurization, and heat treatment on biologically-active human milk proteins. *Pediatr Neonatol*. 2013; 54:360–6.
- Clark JA, Lane RH, MacLennan NK, Holubec H, Dvorakova K, et al. Epidermal growth factor reduces intestinal apoptosis in an experimental model of necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005; 288:G755–62.
- Contador R, Delgado-Adámez J, Delgado FJ, Cava R, Ramírez R. Effect of thermal pasteurisation or high pressure processing on immunoglobulin and leukocyte contents of human milk. *Int Dairy J*. 2013; 32:1–5.
- Czank C, Prime DK, Hartmann B, Simmer K, Hartmann PE. Retention of the immunological proteins of pasteurized human milk in relation to pasteurizer design and practice. *Pediatr Res*. 2009; 66:374–9.
- Demmelmaier H, Koletzko B. Variation of metabolite and hormone contents in human milk. *Clin Perinatol*. 2017; 44:151–64.
- Dhar J, Fichtali J, Skura BJ, et al. Pasteurization efficiency of a HTST system for human milk. *J Food Sci*. 1996; 61:569–72.
- Dvorak B. Milk epidermal growth factor and gut protection. *J Pediatr*. 2010; 156:S31–5.
- EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies). Scientific Opinion on the essential composition of infant and follow-on formulae. *EFSA J*. 2014; 12:3760.
- Ehrenthal DB, Wu P, Trabulsi J. Differences in the protective effect of exclusive breastfeeding on child overweight and obesity by mother's race. *Matern Child Health J*. 2016; 20:1971–9.
- Escuder D. 2017a. Design, operation and optimization of a HTST system for pasteurization of donor human milk in a human milk bank setting (Section VI). In *Calidad de la leche donada durante el procesamiento en un Banco de Leche Humana. Innovación en los procedimientos* (Unpublished PhD thesis). Universidad Complutense de Madrid, Spain.
- ESPGHAN Committee on Nutrition, Arslanoglu S, Corpeleijn W, Moro G, Braegger C, et al. Donor human milk for preterm infants: current evidence and research directions. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2013; 57:535–42.
- Espinosa-Martos I, Montilla A, de Segura AG, Escuder D, Bustos G, et al. Bacteriological, biochemical, and immunological modifications in human

- colostrum after Holder pasteurisation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2013; 56:560–8.
- Evans TJ, Ryley HC, Neale LM, Dodge JA, Lewarne VM. Effect of storage and heat on antimicrobial proteins in human milk. *Arch Dis Child.* 1978; 53:239–41.
- Faria AM, Weiner HL. Oral tolerance and TGF- $\beta$ -producing cells. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2006; 5:179–90.
- Field CJ. The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants. *J Nutr.* 2005; 135:1–4.
- Fields DA, Schneider CR, Pavela G. A narrative review of the associations between six bioactive components in breast milk and infant adiposity. *Obesity (Silver Spring).* 2016; 24:1213–21.
- Ford JE, Law BA, Marshall VME, Reiter B. Influence of the heat treatment of human milk on some of its protective constituents. *J. Pediatr.* 1977; 90:29–35.
- Giribaldi M, Coscia A, Peila C, et al. Pasteurization of human milk by a benchtop High Temperature Short-Time device. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2016; 36:228–33.
- Goelz R, Hihn E, Hamprecht K, Dietz K, Jahn G et al. Effects of different CMV-heat-inactivation-methods on growth factors in human breast milk. *Pediatr Res.* 2009; 65:458–61.
- Goldblum RM, Dill CW, Albrecht TB, et al. Rapid high-temperature treatment of human milk. *J Pediatr.* 1984; 104:380–5.
- Good M, Sodhi CP, Egan CE, Afrazi A, Jia H, et al. Breast milk protects against the development of necrotizing enterocolitis through inhibition of Toll Like Receptor 4 in the intestinal epithelium via activation of the epidermal growth factor receptor. *Mucosal Immunol.* 2015; 8:1166–79.
- Gregory KE, Walker WA. Immunologic factors in human milk and disease prevention in the preterm infant. *Curr Pediatr Rep.* 2013; 1:222–8.
- Gridneva Z, Kuganathan S, Hepworth AR, Tie WJ, Lai CT, et al. Effect of human milk appetite hormones, macronutrients, and infant characteristics on gastric emptying and breastfeeding patterns of term fully breastfed infants. *Nutrients.* 2016; 9:E15.
- Grosvenor CE, Picciano MF, Baumrucker CR. Hormones and growth factors in milk. *Endocr Rev.* 1993; 14:710–28.
- Hamprecht K, Maschmann J, Müller D, Dietz K, Besenthal I, Goelz R, et al. Cytomegalovirus (CMV) inactivation in breast milk: reassessment of pasteurization and freeze-thawing. *Pediatr Res.* 2004; 56:529–35.

- Hasselbalch H, Engelmann MD, Ersboll AK, Jeppesen DL, Fleischer-Michaelsen K. Breastfeeding influence thymic size in late infancy. *Eur J Pediatrics* 1996; 158:964–7.
- Hill DR, Newburg DS. Clinical applications of bioactive milk components. *Nutr Rev*. 2015; 73:463–76.
- Jarvinen KM, Laine ST, Jarvenpaa AL, Suomalainen HK. Does low IgA in human milk predispose the infant to development of cow's milk allergy? *Pediatr Res*. 2000; 48:457–62.
- Jones MK, Tomikawa M, Mohajer B, Tarnawski AS. Gastrointestinal mucosal regeneration: role of growth factors. *Front Biosci*. 1999; 4:D303–9.
- Kainonen E, Rautava S, Isolauri E. Immunological programming by breast milk creates an anti-inflammatory cytokine milieu in breast-fed infants compared to formula-fed infants. *Br J Nutr*. 2013; 109:1962–70.
- Kalliomaki M, Ouwehand A, Arvilommi H, Kero P, Isolauri E. Transforming growth factor- $\beta$  in breast milk: a potential regulator of atopic disease at an early age. *J Allergy Clin Immunol*. 1999; 104:1251–7.
- Kiersen JA, Dimatteo DM, Locke RG, Mackley AB, Spear ML. Ghrelin and cholecystokinin in term and preterm human breast milk. *Acta Paediatr*. 2006; 95:991–5.
- Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev*. 2005; 85:495–522.
- Landers S, Updegrave K. Bacteriological screening of donor human milk before and after Holder pasteurization. *Breastfeed Med*. 2010; 5:117–21.
- Lawrence RM, Pane CA. Human breast milk: current concepts of immunology and infectious diseases. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 2007; 37:7–36.
- Lewandowski AJ, Lamata P, Francis JM, Piechnik SK, Ferreira VM, et al. Breast milk consumption in preterm neonates and cardiac shape in adulthood. *Pediatrics*. 2016; 138.
- Lewis ED, Richard C, Larsen BM, Field CJ. The importance of human milk for immunity in preterm infants. *Clin Perinatol*. 2017; 44:23–47.
- Ley SH, Hanley AJ, Stone D, O'Connor DL. Effects of pasteurization on adiponectin and insulin concentrations in donor human milk. *Pediatr Res*. 2011; 70:278–81.
- Liebhaver M, Asquith MT, Olds-Arroyo L, Sunshine P. Alterations of lymphocytes and of antibody content of human milk after processing. *J Pediatr*. 1977; 91:897–900.
- Lodge CJ, Tan DJ, Lau MX, Dai X, Tham R, et al. Breastfeeding and asthma and allergies: a systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatr*. 2015; 104:38–53.

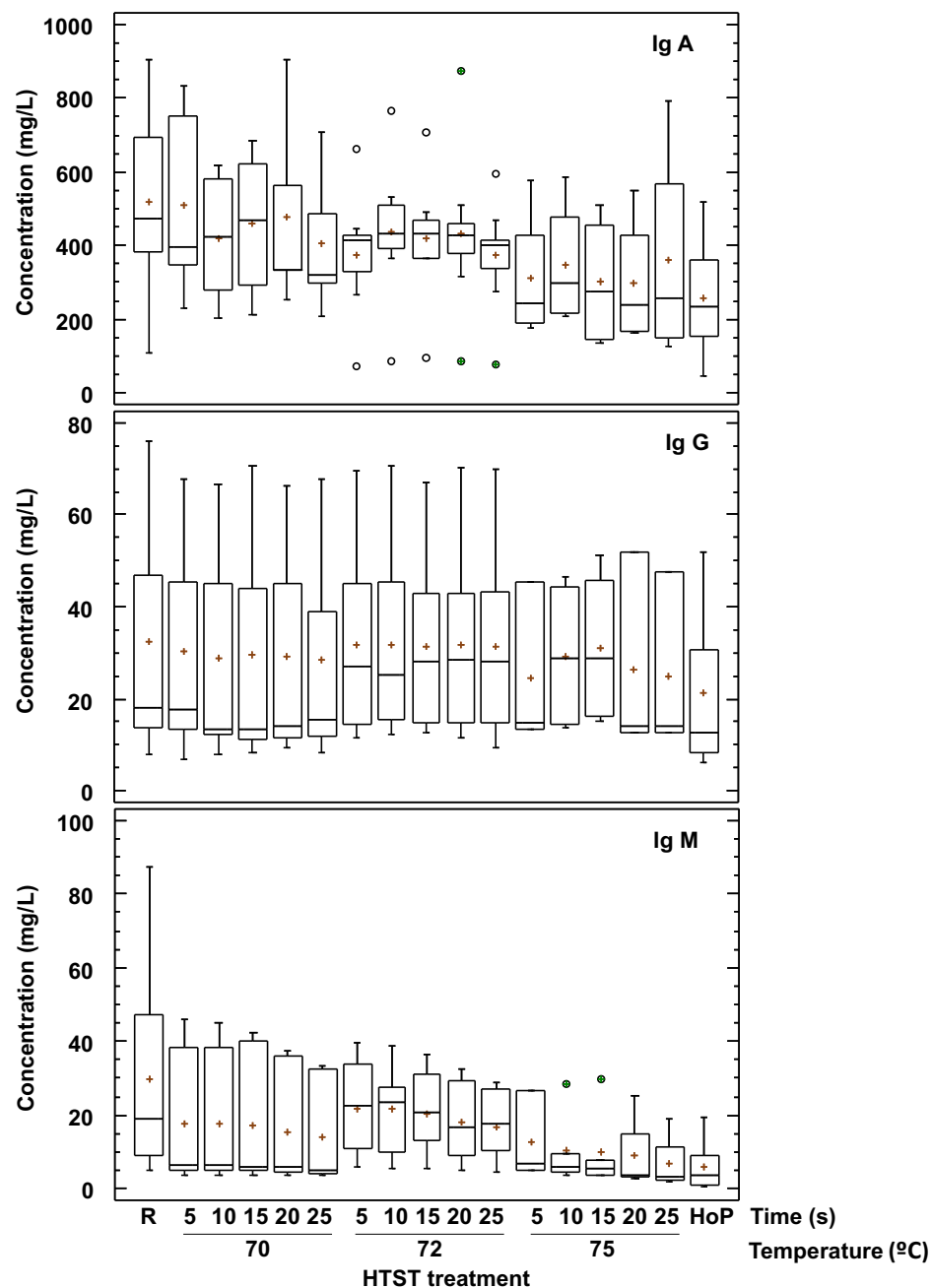
- M'Rabet, L, Arjen Paul Vos AP, Boehm, G, Garssen J. Breast-feeding and its role in early development of the immune system in infants: consequences for health later in life. *J Nutr*. 2008; 138:1782S–90S.
- McPherson RJ, Wagner CL. The effect of pasteurization on transforming growth factor alpha and transforming growth factor beta 2 concentrations in human milk. *Adv Exp Med Biol*. 2001; 501:559–66.
- Nair RR, Warner BB, Warner BW. Role of epidermal growth factor and other growth factors in the prevention of necrotizing enterocolitis. *Semin Perinatol*. 2008; 32:107–13.
- Newburg D, Woo, J, Morrow A. Characteristics and potential functions of human milk adiponectin. *J. Pediatr*. 2010; 156:S41–6.
- Nguyen DN, Sangild PT, Ostergaard MV, Bering SB, Chatterton DE. Transforming growth factor- $\beta$ 2 and endotoxin interact to regulate homeostasis via interleukin-8 levels in the immature intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2014; 307:G689–99.
- O'Connor DL, Ewaschuk JB, Unger S. Human milk pasteurization: benefits and risks. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2015; 18:269–75.
- Oddy WH, Halonen M, Martinez FD, Lohman IC, Stern DA, et al. TGF- $\beta$  in human milk is associated with wheeze in infancy. *J Allergy Clin Immunol*. 2003; 112:723–8.
- Peila C, Emmerik NE, Giribaldi M, Stahl B, Ruitenberg JE, et al. Human milk processing: a systematic review of innovative techniques to ensure the safety and quality of donor milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2017; 64:353–61.
- Peila C, Moro GE, Bertino E, et al. The effect of Holder pasteurization on nutrients and biologically-active components in donor human milk: a review. *Nutrients*. 2016; 8:477.
- Penttilä I. Milk-derived transforming growth factor- $\beta$  and the infant immune response. *J Pediatr* 2010; 156:S21–5.
- Penttilä IA, van Spriel AB, Zhang MF, Xian CJ, Steeb CB, Cummins AG, et al. Transforming growth factor- $\beta$  levels in maternal milk and expression in postnatal rat duodenum and ileum. *Pediatr Res*. 1998; 44:524–31.
- Permanyer M, Castellote C, Ramírez-Santana C, Audí C, Pérez-Cano FJ, et al. Maintenance of breast milk immunoglobulin A after high-pressure processing. *J Dairy Sci*. 2010; 93:877–83.
- Picaud JC, Buffin R. Human milk-treatment and quality of banked human milk. *Clin Perinatal*. 2017; 44:95–119.

- Quigley M, McGuire W. Formula versus donor breast milk for feeding preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014; 22:CD002971.
- Rautava S, Nanthakumar NN, Dubert-Ferrandon A, Lu L, Rautava J, et al. Breast milk-transforming growth factor- $\beta$  specifically attenuates IL-1 $\beta$ -induced inflammatory responses in the immature human intestine via an SMAD6- and ERK-dependent mechanism. *Neonatology*. 2011; 99:192–201.
- Reeves AA, Johnson MC, Vasquez MM, Maheshwari A, Blanco CL. TGF- $\beta$ 2, a protective intestinal cytokine, is abundant in maternal human milk and human-derived fortifiers but not in donor human milk. *Breastfeed Med*. 2013; 8:496–502.
- Rogier EW, Frantz AL, Bruno ME, Wedlund L, Cohen DA, et al. Secretory antibodies in breast milk promote long-term intestinal homeostasis by regulating the gut microbiota and host gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014; 111:3074–9.
- Savilahti E, Siltanen M, Kajosaari M, Vaarala O, Saarinen KM. IgA antibodies, TGF- $\beta$ 1 and - $\beta$ 2, and soluble CD14 in the colostrum and development of atopy by age 4. *Pediatr Res*. 2005, 58:1300–5.
- Savino F, Liguori SA, Fissore MF, Oggero R. 2009. Breast milk hormones and their protective effect on obesity. *Int J Pediatr Endocrinol*. 2009; 2009:327505.
- Savino F, Liguori SA, Petrucci E, Lupica MM, Fissore MF, et al. Evaluation of leptin in breast milk, lactating mothers and their infants. *Eur J Clin Nutr*. 2010; 64:972–7.
- Savino F, Sardo A, Rossi L, Benetti S, Savino A, et al. Mother and infant body mass index, breast milk leptin and their serum leptin values. *Nutrients*. 2016; 8:383.
- Silvestre D, Miranda M, Muriach M, Almansa I, Jareno E, et al. Antioxidant capacity of human milk: effect of thermal conditions for the pasteurization. *Acta Paediatr*. 2008; 97:1070–4.
- Smith KM, Eaton AD, Finlayson LM, Garside P. Oral tolerance. *AmJ Respir Crit Care Med* 2000; 162:S175–8.
- Turfkruyer M, Verhasselt V. Breast milk and its impact on maturation of the neonatal immune system. *Curr Opin Infect Dis*. 2015. 28:199–206.
- U.S. Department of Health and Human Services. *The Surgeon General's Call to Action to Support Breastfeeding*. Washington, DC: U.S. Department of Health and Human Services, Office of the Surgeon General; 2011.
- Untalan PB, Keeney SE, Palkowetz KH, Rivera A, Goldman AS. Heat susceptibility of interleukin-10 and other cytokines in donor human milk. *Breastfeed Med*. 2009; 4:137–44.

- Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGF  $\beta$  in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 2006; 24:179–89.
- Verhasselt V. Neonatal tolerance under breastfeeding influence: the presence of allergen and transforming growth factor- $\beta$  in breast milk protects the progeny from allergic asthma. *J Pediatr* 2010; 156:S16–20.
- Warner BW, Warner BB. Role of epidermal growth factor in the pathogenesis of neonatal necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg*. 2005; 14:175–80.
- Weaver LT, Arthur HM, Bunn JE, Thomas JE. Human milk IgA concentrations during the first year of lactation. *Arch Dis Child*. 1998; 78:235–9.
- Weber G, Drickamer HG. The effect of high pressure upon proteins and other biomolecules. *Q Rev Biophys*. 1983; 16:89–112.
- Woo JG, Martin LJ. Does breastfeeding protect against childhood obesity? Moving beyond observational evidence. *Curr Obes Rep*. 2015; 4:207–16.
- Woo JG, Guerrero ML, Altaye M, Ruiz-Palacios GM, Martin LJ, Dubert-Ferrandon A, Newburg DS, Morrow AL. Human milk adiponectin is associated with infant growth in two independent cohorts. *Breastfeed Med*. 2009; 4:101–9.
- Zasada M, Kwinta P, Durlak W, Bik-Multanowski M, Madetko-Talowska A, et al. Development and maturation of the immune system in preterm neonates: results from a whole genome expression study. *BioMed Res Int*. 2014; 2014:498318.
- Zhang Q, Cundiff JK, Maria SD, McMahon RJ, Wickham MS, et al. Differential digestion of human milk proteins in a simulated stomach model. *J Proteome Res*. 2014; 13:1055–64.

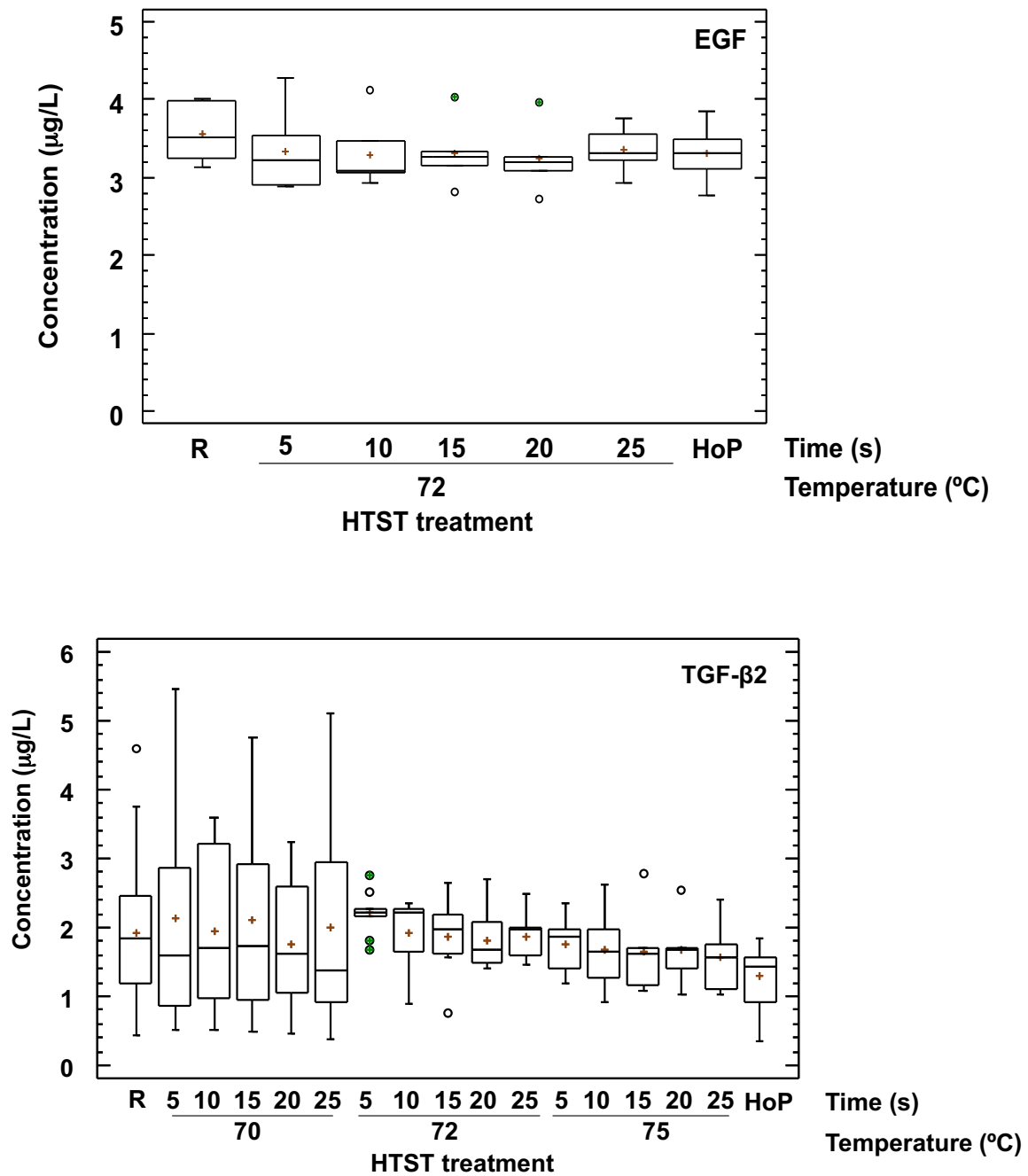


## VII. 6. FIGURES

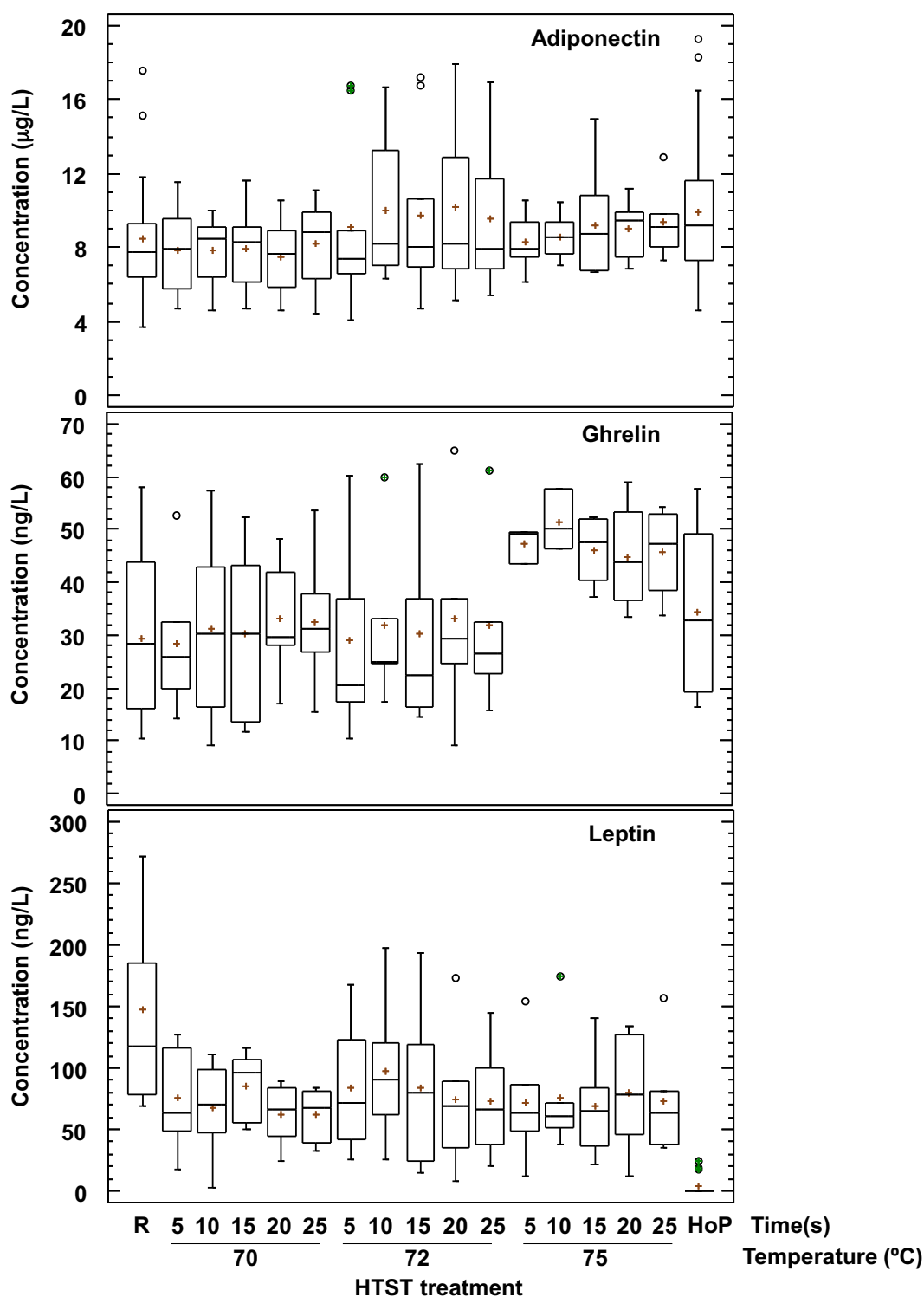


**Figure 1.** Concentration of IgA, IgG, and IgM in DHM before (R) and after HTST treatment (at 70, 72 and 75°C for 5, 10, 15, 20, 25 seconds) or Holder pasteurization (HoP, 62.5°C, 30 min).

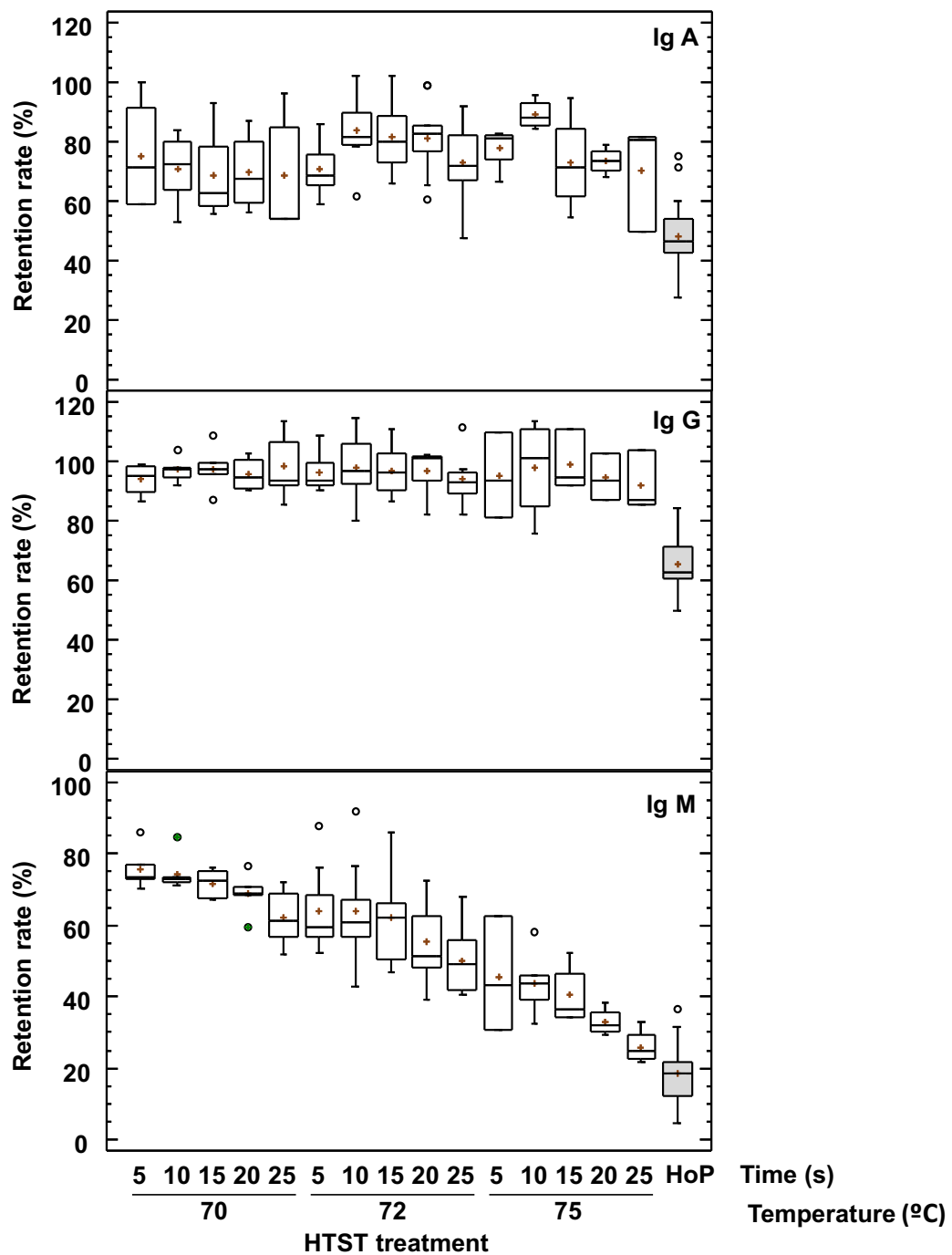




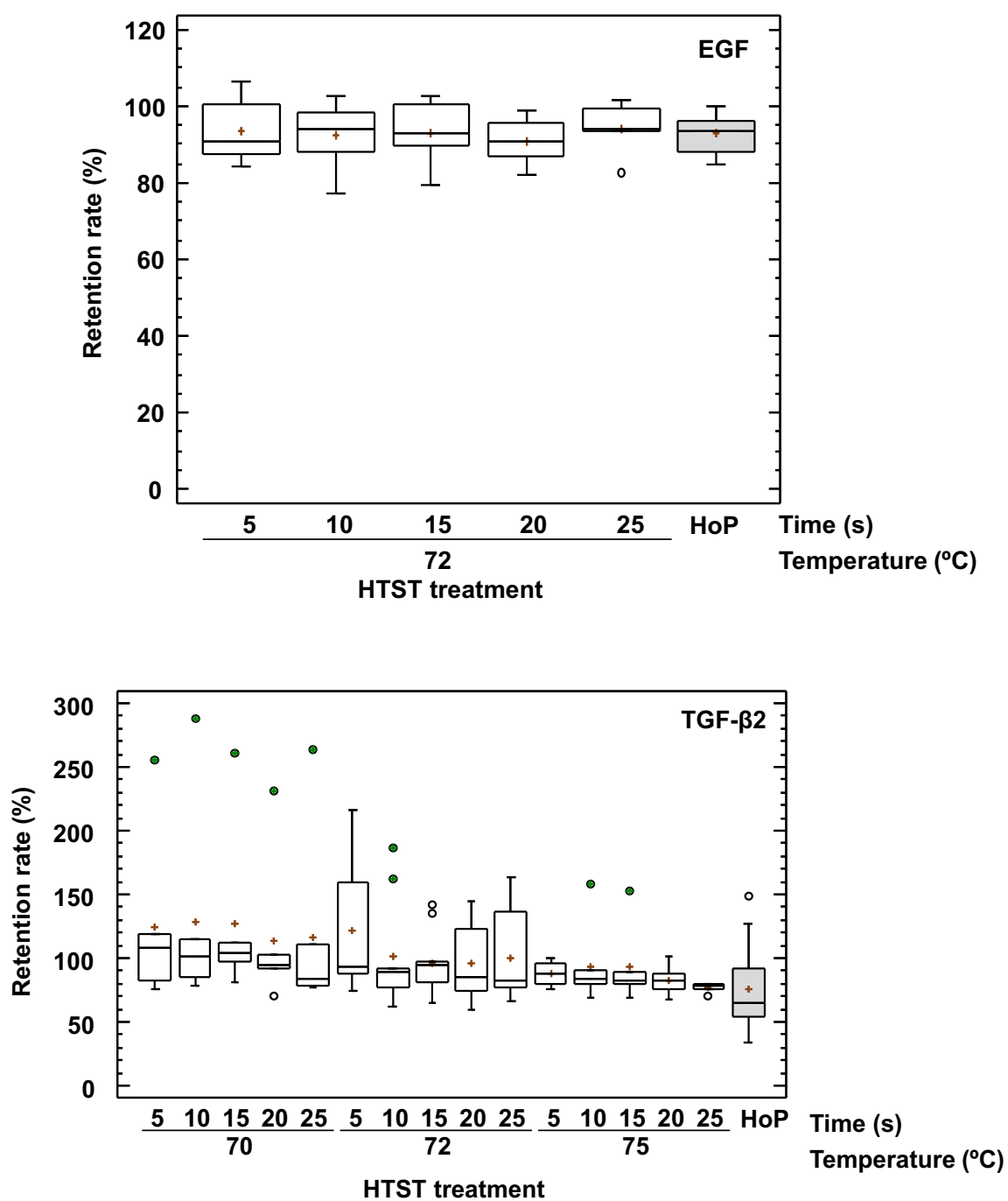
**Figure 2.** Concentration of epidermal growth factor (EGF) and transforming growth factor  $\beta_2$  (TGF- $\beta_2$ ) in DHM before (R) and after HTST treatment (at 70, 72 and 75°C for 5, 10, 15, 20, 25 seconds) or Holder pasteurization (HoP, 62.5°C, 30 min).



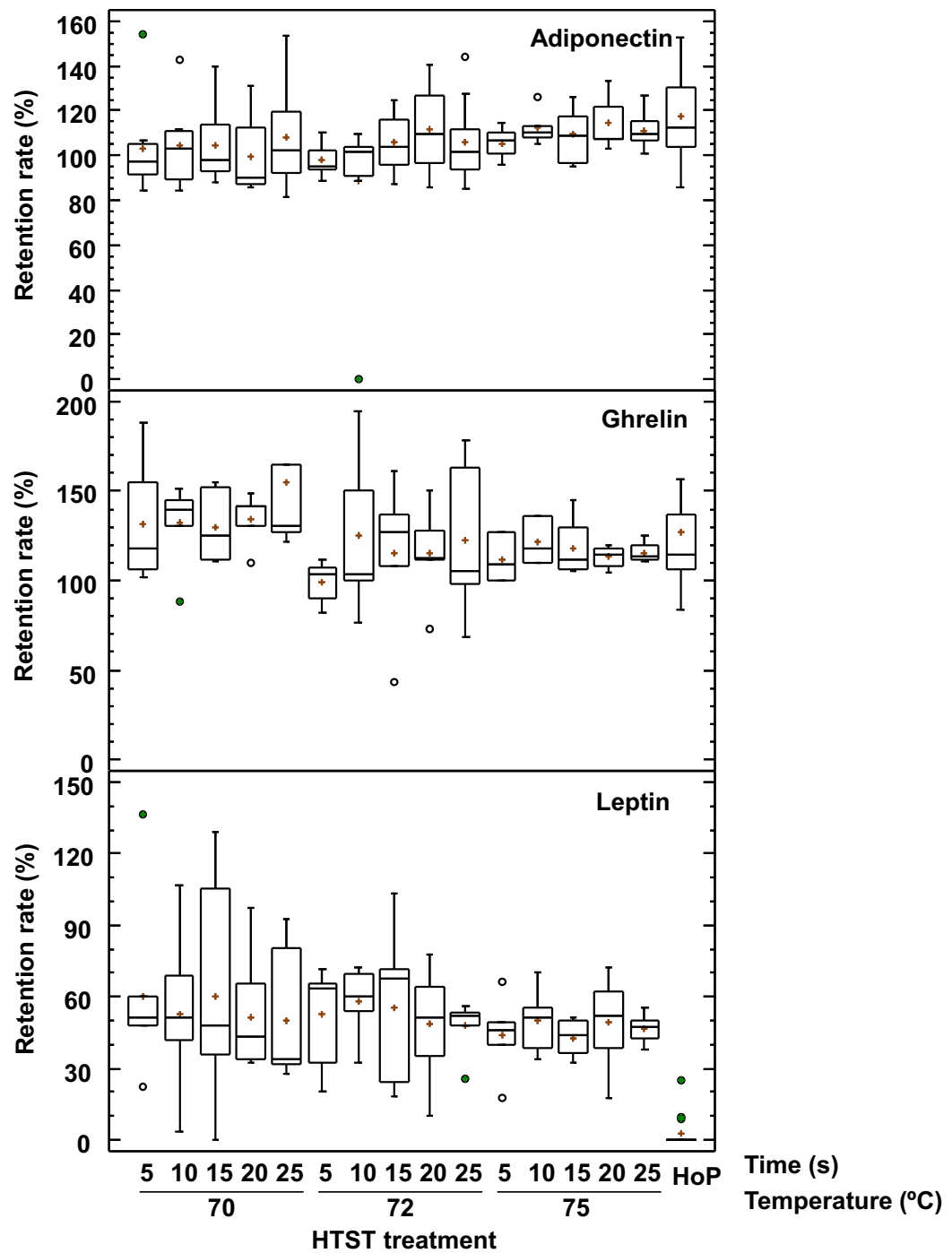
**Figure 3.** Concentration of adiponectin, ghrelin, and leptin in DHM before (R) and after HTST treatment (at 70, 72 and 75°C for 5, 10, 15, 20, 25 seconds) or Holder pasteurization (HoP, 62.5°C, 30 min).



**Figure 4.** Percentage of IgA, IgG, and IgM retention in DHM after HTST treatment (at 70, 72 and 75°C for 5, 10, 15, 20, 25 seconds) or Holder pasteurization (HoP, 62.5°C, 30 min).



**Figure 5.** Percentage of epidermal growth factor (EGF) and transforming growth factor  $\beta 2$  (TGF- $\beta 2$ ) retention in DHM after HTST treatment (at 70, 72 and 75°C for 5, 10, 15, 20, 25 seconds) or Holder pasteurization (HoP, 62.5°C, 30 min).



**Figure 6.** Percentage of adiponectin, ghrelin, and leptin retention in DHM after HTST treatment (at 70, 72 and 75°C for 5, 10, 15, 20, 25 seconds) or Holder pasteurization (HoP, 62.5°C, 30 min).

## VII. 7. TABLES

**Table 1.** Concentration of immunoglobulins, growth factors and hormones in raw DHM batches.

	<b>n</b>	<b>Median</b>	<b>IQR</b>
<b>Immunoglobulins</b>			
IgA (mg/L)	18	473.32	381.51 – 694.43
IgG (mg/L)	17	17.99	13.59 – 46.84
IgM (mg/L)	20	18.79	9.22 – 47.46
<b>Growth factors</b>			
EGF ( $\mu\text{g/L}$ )	6	3.51	3.24 – 3.99
TGF- $\beta_2$ ( $\mu\text{g/L}$ )	21	1.84	1.20 – 2.45
<b>Hormones</b>			
Adiponectin ( $\mu\text{g/L}$ )	24	7.74	6.41 – 9.27
Ghrelin (ng/L)	16	25.53	14.52 – 39.06
Leptin (ng/L)	20	116.97	79.05 – 184.50

n: number of DHM batches analyzed; IQR: interquartile range (Q25-Q75).

EGF: epidermal growth factor; Ig: immunoglobulin; TGF- $\beta_2$ : transforming growth factor- $\beta_2$ .

**Table 2.** Percentage of immunoglobulin retention in DHM after HTST treatment (at 70, 72 and 75°C for 5, 10, 15, 20, 25 seconds) or Holder pasteurization (62.5°C, 30 min).

Temperature (°C)	HTST treatment										Holder			
	Time (seconds)										pasteurization (62.5°C, 30 min)			
	5		10		15		20		25		n	Median		
	n	Median (IQR)	n	Median (IQR)	n	Median (IQR)	n	Median (IQR)	n	Median (IQR)				
IgA	70	4	71 (59–92)	5	72 (64–80)	4	63 (58–78)	4	67 (59–80)	5	54 (54–85)	5	35 (30–44)	0.102
	72	9	68 <sup>a</sup> (66–76)	9	82 <sup>a</sup> (79–90)	9	80 <sup>a</sup> (73–88)	9	83 <sup>a</sup> (76–85)	9	72 <sup>a</sup> (67–82)	9	51 <sup>b</sup> (44–54)	<0.001
	75	4	81 <sup>ab</sup> (74–82)	4	88 <sup>b</sup> (85–93)	4	71 <sup>ab</sup> (62–84)	4	73 <sup>ab</sup> (70–77)	4	80 <sup>ab</sup> (50–81)	4	48 <sup>a</sup> (42–64)	0.034
IgG	70	4	95 <sup>a</sup> (90–98)	5	97 <sup>a</sup> (95–98)	5	97 <sup>a</sup> (95–99)	4	95 <sup>a</sup> (91–100)	5	93 <sup>a</sup> (92–106)	5	61 <sup>b</sup> (56–71)	0.028
	72	8	94 <sup>a</sup> (92–100)	8	97 <sup>a</sup> (92–106)	8	96 <sup>a</sup> (90–102)	8	101 <sup>a</sup> (93–102)	8	93 <sup>a</sup> (89–96)	8	64 <sup>b</sup> (61–74)	0.001
	75	3	94 (81–110)	4	101 (85–111)	3	95 (92–111)	3	93 (87–103)	3	87 (86–104)	4	67 (56–71)	0.074
IgM	70	6	73 <sup>a</sup> (73–77)	6	73 <sup>a</sup> (72–73)	6	72 <sup>ab</sup> (68–75)	6	69 <sup>ab</sup> (68–71)	6	61 <sup>b</sup> (57–69)	6	15 <sup>c</sup> (11–21)	<0.001
	72	9	60 <sup>a</sup> (57–69)	9	61 <sup>a</sup> (57–67)	9	62 <sup>a</sup> (50–66)	9	51 <sup>a</sup> (48–63)	9	49 <sup>a</sup> (42–56)	9	20 <sup>b</sup> (18–23)	<0.001
	75	3	43 <sup>a</sup> (30–63)	5	44 <sup>a</sup> (39–46)	5	37 <sup>a</sup> (34–46)	4	32 <sup>ab</sup> (30–36)	4	25 <sup>ab</sup> (23–29)	5	12 <sup>b</sup> (9–21)	0.002

Ig: immunoglobulin; IQR: interquartile range (Q25–Q75); n: number of DHM batches analyzed.

\*Kruskal-Wallis tests. Different superscript letters means difference in *post-hoc* pairwise comparison using Bonferroni test

**Table 3.** Percentage of retention of growth factors in DHM after HTST treatment (at 70, 72 and 75°C for 5, 10, 15, 20, 25 seconds) or Holder pasteurization (62.5°C, 30 min).

	Temperature (°C)	HTST treatment										Holder		<i>p</i> -value*
		Time (seconds)										pasteurization (62.5°C, 30 min)		
		5		10		15		20		25		n	Median	
		n	Median (IQR)	n	Median (IQR)	n	Median (IQR)	n	Median (IQR)	n	Median (IQR)	n	Median (IQR)	
EGF	72	6	91 (87 – 100)	6	94 (88 – 98)	6	93 (90 – 101)	6	91 (87 – 95)	6	94 (93 – 100)	6	94 (88 – 96)	0.956
TGF-β <sub>2</sub>	70	6	107 (82 – 119)	6	101 (85 – 115)	6	104 (97 – 112)	6	94 (91 – 103)	6	84 (78 – 111)	6	70 (58 – 79)	0.176
	72	9	93 (88 – 159)	9	90 (77 – 92)	9	94 (81 – 98)	9	85 (74 – 123)	9	83 (77 – 136)	9	65 (58 – 123)	0.480
	75	5	88 (79 – 95)	6	83 (80 – 91)	6	83 (80 – 90)	5	82 (76 – 88)	5	78 (76 – 80)	6	52 (47 – 64)	0.088

EGF: epidermal growth factor; IQR: interquartile range (Q25-Q75); n: number of DHM batches analyzed; TGF-β<sub>2</sub>: transforming growth factor-β<sub>2</sub>;

\*Kruskal-Wallis tests.



**Table 4.** Percentage of retention of hormones in DHM after HTST treatment (at 70, 72 and 75°C for 5, 10, 15, 20, 25 seconds) or Holder pasteurization (62.5°C, 30 min).

	Temperature (°C)	HTST treatment										Holder pasteurization (62.5°C, 30 min)		<i>p</i> -value*
		Time (seconds)												
		5		10		15		20		25		n	Median (IQR)	
	n	Median (IQR)	n	Median (IQR)	n	Median (IQR)	n	Median (IQR)	n	Median (IQR)	n	Median (IQR)		
Adiponectin	70	8	98 (91–105)	8	103 (90–111)	8	98 (93–114)	8	90 (87–112)	8	102 (93–119)	8	113 (100–141)	0.606
	72	9	95 (94–102)	9	101 (91–104)	9	103 (96–116)	9	109 (97–127)	9	102 (93–112)	9	105 (103–127)	0.287
	75	5	106 (101–110)	6	110 (108–113)	7	109 (96–118)	5	108 (108–122)	6	109 (107–115)	7	122 (110–130)	0.307
Ghrelin	70	6	118 (107–155)	6	140 (131–145)	6	125 (111–153)	6	141 (131–142)	6	131 (127–165)	6	140 (112–156)	0.917
	72	5	104 (90–107)	5	104 (100–151)	5	127 (108–138)	5	112 (111–128)	5	106 (98–163)	5	113 (100–123)	0.871
	75	3	108 (100–127)	3	118 (110–136)	4	112 (107–130)	4	114 (108–118)	4	113 (112–120)	4	113 (103–115)	0.848
Leptin	70	7	52 <sup>a</sup> (48–60)	7	51 <sup>a</sup> (42–69)	7	48 <sup>a</sup> (36–105)	7	44 <sup>ab</sup> (34–65)	6	34 <sup>ab</sup> (32–80)	7	0 <sup>b</sup> (0–0)	0.004
	72	7	52 <sup>a</sup> (35–64)	6	60 <sup>a</sup> (54–70)	7	68 <sup>a</sup> (24–71)	6	64 <sup>a</sup> (32–66)	7	52 <sup>a</sup> (48–54)	7	0 <sup>b</sup> (0–9)	0.002
	75	6	46 <sup>a</sup> (40–49)	6	51 <sup>a</sup> (39–56)	6	44 <sup>a</sup> (36–50)	6	52 <sup>a</sup> (38–62)	6	47 <sup>a</sup> (43–50)	6	0 <sup>b</sup> (0–0)	0.008

IQR: interquartile range (Q25–Q75); n: number of DHM batches analyzed.

\*Kruskal-Wallis tests. Different superscript letters means difference in post-hoc pairwise comparison using Bonferroni test.

**VIII. EFECTO DE LA PASTEURIZACIÓN HTST Y HOLDER EN LA  
COMPOSICIÓN NUTRICIONAL Y BIOQUÍMICA  
DE LA LECHE HUMANA DONADA**

---

**EFFECT OF HTST AND HOLDER PASTEURIZATION ON  
NUTRITIONAL AND BIOCHEMICAL COMPOSITION  
OF DONOR HUMAN MILK**

*Manuscrito en preparación*



## VIII. 1. INTRODUCTION

Own's mother milk (OMM) provides the nutrients that best fit the needs of the growing infant. Human milk composition is dynamic, and varies depending on several maternal and environmental factors, including gestational age, the feeding fraction, the circadian rhythm, the lactation period, and, also, between mothers and populations (Dritsakou *et al.*, 2016; Wojcik *et al.*, 2009). When OMM is unavailable, or is in short supply to meet the nutritional requirements of the preterm infant, which is common in Neonatal Intensive Care Units (NICUs), the next best alternative is the use of donor human milk (DHM) (ESPGHAN *et al.*, 2013). The process to obtain HDM in human milk banks (HMB), from expression and management of milk to its storage and pasteurization may also exert a strong influence on the composition of human milk (Ballard and Morrow, 2013).

Holder pasteurization (HoP; 62.5°C, 30 minutes) is the most widely employed treatment in HMBs because it is easy to perform and leads to a good compromise between microbiological safety and nutritional quality of milk. Nonetheless, it is also well known that HoP affects some of the nutritional and biochemical properties of DHM (Picaud and Buffin, 2017). In addition to providing amino acids released during intestinal proteolysis, several milk proteins display particular biological functions, such as specific bacteriostatic properties of lactoferrin or lysozyme (Lönnerdal, 2017). In this respect, although HoP may not alter the total concentration of proteins, their specific bioactive functions are affected (Silvestre *et al.*, 2006).

In contrast, human milk carbohydrates, including lactose and oligosaccharides, appear to be unaffected by pasteurization (Bertino *et al.*, 2008; García-Lara *et al.*, 2013). Lactose (6.7 to 7.8 g/dL), which is the least variable of the macronutrients (Ballard and Morrow, 2013), is found in higher concentrations when mothers produce higher quantities of milk (Nommsen *et al.*, 1991). Human milk oligosaccharides (HMO) are the second carbohydrate fraction in human milk, comprising approximately 1 g/dL, although their concentration depends on stage of lactation and maternal genetic factors (Bode, 2015).

Lipids (98–99% triacylglycerols [TAG]) are the major source of energy that human milk provides to the infant, but they also supply essential nutrients, such as polyunsaturated fatty acids (PUFA) (Delplanque *et al.*, 2015). Fatty acid (FA) composition of milk has demonstrated important biological effects on gastrointestinal function, lipid and lipoprotein metabolism, membrane composition and function, infant growth, neurodevelopment, and immune function (Koletzko, 2016). Long chain (LC)-PUFAs, in particular  $\omega$ -6 arachidonic acid [ARA; C20:4(n-6)] and  $\omega$ -3 docosahexaenoic acid [DHA; C22:6(n-3)], have received considerable attention because many of the biological effects of essential FAs in early life appear to be mediated by LC-PUFA rather than by their precursor FAs (Brenna *et al.*, 2007).

Digestion of milk TAG in breastfed infants is catalyzed by the concerted action of gastric lipase, colipase-dependent pancreatic lipase, and bile salt-stimulated lipase (BSSL). Most BSSL in infant gut comes from human milk and only a small fraction of these lipases originates in the infant's exocrine pancreas. BSSL shifts the final products of TAG digestion from initial monoglycerides and free FAs to glycerol and more free FAs, which may promote efficient absorption. Moreover, BSSL is likely to promote efficient use of milk cholesterol and fat-soluble vitamin esters and LC-PUFAs (>C18) (Hernell and Bläckberg, 1994). While milk FAs, including PUFAs, are unaffected by HoP, a complete degradation of BSSL, both in concentration and enzymatic activity, has been found after this heat treatment (Henderson *et al.*, 1998; Wardell *et al.*, 1981).

Micronutrient concentration in milk can be greatly influenced by maternal dietary intake and status, particularly regarding vitamins. However, very few data are available on vitamin concentrations in human milk. Current intake recommendations for breastfed infants and lactating women have been established on the basis of published reports targeting the general population (Hampel *et al.*, 2017). Evidences on the impact of HoP on DHM vitamins are diverse. The levels of several water-soluble vitamins, such as vitamin C, folate or B<sub>6</sub>, decrease after treatment whereas no appreciable change in the concentration of vitamins A, D and E have been observed (Peila *et al.*, 2016).

Understanding the potential impact of pasteurization on milk components provides an important tool for the management of infant feeding, particularly to meet the increased nutritional requirements of very low birth weight infants. Recently, the high-temperature short-time (HTST) pasteurization has been proposed for the treatment of DHM (Peila *et al.*, 2017; Picaud and Buffin, 2017). This method involves heating milk rapidly to 72°C, keeping it for a few seconds (usually 15 s), and cooling it down immediately. This treatment seems better than HoP at preserving the nutritional and biological quality of DHM (Baro *et al.*, 2011; Giribaldi *et al.*, 2016; Goelz *et al.*, 2009; Silvestre *et al.*, 2008).

In this context, the objective of this work was to evaluate the effect of HTST pasteurization, performed in a continuous system designed to operate in the HMB environment, on macronutrients, minor carbohydrates and vitamin concentrations and on the FA profile and BSSL activity of DHM. Furthermore, we aimed to compare the effect of HTST treatment at different temperatures and holding times in relation to standard HoP.

## VIII. 2. MATERIAL AND METHODS

### VIII. 2. 1. Human milk samples

DHM samples were obtained from the HMB located at the Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid, Spain) as it has been described previously (Escuder., 2017). Milk collection was performed following a specific protocol approved by the local ethics committee and informed consent was obtained from each donor. Milk from multiple donors (~12 donors) was pooled to a volume of approximately 10 L, composing a production batch. For this study, 10 production batches were processed in the equipment described by Escuder (2017). Aliquots from each batch were separated before pasteurization: 111 mL of pooled raw milk served as control, 120 mL were used for HoP, and the rest was subjected to different HTST treatment conditions: 70, 72 and 75°C for 5, 10, 15, 20 and 25 s. Batch preparation and heat processing techniques have been described in detail previously (Escuder, 2017). Some aliquots of raw and heat-treated DHM were used immediately after the treatments to determine the macronutrient content, while the rest of them were stored frozen (-20°C) until further analysis. Those aliquots intended to be used for the quantification of light-sensitive vitamins were stored in black microcentrifuge tubes (LTT-170-X; Mettler Toledo, L'Hospitalet de Llobregat, Spain).

### VIII. 2. 2. Analysis of macronutrients

Total fat, protein and lactose in raw and heat-treated DHM were measured in duplicate by Fourier Transformation Infrared Spectroscopy (FTIR) in a mid-infrared (mid-IR) milk analyser (MilkoScan FT2, FOSS S.A., Barcelona, Spain) properly calibrated for analysis of human milk. A set of 10 human samples covering the whole biological range for each milk component of interest (total fat, protein, and lactose) were used to adjust the slope and the intercept for each component (LILCAM, Laboratorio Interprofesional de Castilla La Mancha, Talavera de la Reina, Toledo, Spain).

### VIII. 2. 3. Determination of lactose, *myo*-inositol and glucose

Lactose, *myo*-inositol and glucose analysis in raw and heat-treated DHM samples was carried out by gas chromatography (GC) with flame ionisation detection (FID) following the method described by Montilla *et al.* (2005) with the modifications described by Espinosa-Martos *et al.* (2013). The identity of carbohydrates present in DHM samples was confirmed by comparison with relative retention times of standard samples. Quantitative analysis was carried out by the internal standard method. Response factors were calculated after triplicate analysis of standard solutions (glucose, *myo*-inositol and lactose) at concentrations ranging from 1 to 6 g/L for lactose and from 1 to 50 mg/L for glucose and *myo*-inositol. All analyses were done in duplicate.

#### VIII. 2. 4. Analysis of lipids

Total fat extraction in DHM samples was achieved using a Pressurized Liquid Extraction (PLE) system and lipid fractionation by Flash Chromatography (FC), as reported by Castro-Gomez *et al.* (2016). Lipid fractions collected were evaporated under nitrogen stream, weighed, and stored at -25°C. All analyses were carried out in triplicate.

Separation and quantification of lipid classes was performed by HPLC coupled to an evaporative light scattering detector as described by Castro-Gómez *et al.* (2014b). Lipid standards were analyzed under the same conditions and used for further identification.

FAs from the DHM samples were directly derivatized to FA methyl esters (FAME) according to Castro-Gómez *et al.* (2014). FAMES were analyzed using Agilent 6890N GC system (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, California, USA) equipped with a flame ionization detector (FID) connected to a 5973N quadrupole mass selective detector (MSD) (Agilent Technologies Inc.). GC was performed on a CP-Sil 88 fused-silica capillary column (100 m × 0.25 mm i.d. × 0.2 µm film thickness; Chrompack, Middelburg, the Netherlands) as described previously (Rodríguez-Alcala and Fontecha, 2009). MS detector was operated in electron impact (EI) mode at 70 eV, the transfer line temperature was set at 250°C, the ion source at 230°C, and the quadrupole temperature at 150°C; the scan was set to obtain a mass spectrum over a mass range of 50-500 Da. The sample volume injected was 1 µl at 1:25 split ratio. Anhydrous milk fat (reference material BCR-164; Fedelco Inc., Madrid, Spain) was assayed to know and calculate the response factor for FAMES. Supelco 37 Component FAME Mix (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) and NIST MS database (version 2005) were used for qualitative purposes.

Cholesterol was determined by GC-FID using a RTX-65 TAG fused-silica capillary column Crossbond and h 65% diphenyl/35% dimethyl polysiloxane as stationary phase (30 m × 0.22 mm × 0.10 µm) (Restek Corporation, Bellefonte, Pennsylvania, USA). Derivatization of samples was following Castro-Gómez *et al.* (2015). 5α-Cholestane (13.75 mg/mL in hexane) was used as internal standard.

Determination and identification of phospholipid molecular species was accomplished by ultraperformance liquid chromatography/quadruple-time-of-flight mass spectrometry (UPLC/QToF-MS) (Castro-Gómez *et al.*, 2017).

#### VIII. 2. 5. Determination of BSSL

BSSL activity in DHM samples before and after different HTST treatments and HoP was determined using a lipase activity assay kit (Sigma-Aldrich Química S.L., Madrid, Spain). Frozen DHM aliquots (n=24) were thawed and diluted with distilled

water (1/25 for raw and 1/10 for heat-treated samples) before being assayed in duplicate according to the manufacturer instructions. Sodium taurocholate (10 mM) was added to the lipase assay buffer. The absorbance was determined at 570 nm using a Zenyth 200 microplate reader and spectrophotometer (Anthos Labtec, Salzburg, Austria) after 100 min at 37°C. Measured absorbance at 570 nm was transformed into units of BSSL activity per mL (U/mL). One unit of lipase activity was defined as the amount of enzyme that will generate 1.0  $\mu$ mole of glycerol from triglycerides per minute at 37°C. The enzyme activity in heat-treated samples was expressed as the remaining activity of lipase in relation to that detected in raw DHM samples.

### VIII. 2. 6. Analysis of vitamins

The analysis of hydrosoluble vitamins present in raw and heat-treated DHM samples was carried out by UPLC–tandem mass spectrometry (UPLC–MS/MS) following the method described by Hampel *et al.* (2012). Samples were subjected to protein precipitation and removal of non-polar constituents by diethyl ether prior to analysis. Quantification was done by ratio response to the stable-isotope-labeled internal standards. The limit of quantitation was between 0.05 and 5 ppb depending on the vitamin.

The concentrations of retinol (the main form of vitamin A in milk),  $\alpha$ -tocopherol (the main biological form of vitamin E), and  $\gamma$ -tocopherol were determined by HPLC following the method was described by Romeu-Nadal *et al.* (2008). The concentration of tocopherols was determined using the UltiMate™ 3000 Rapid Separation System (Fisher Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) equipped with a fluorescence detector (excitation wavelength: 295 nm; cutoff emission filter: 345 nm). All-*trans* retinol is the main form of vitamin A in milk and was determined by UV detection (wavelength 325 nm). External quantification was performed based on calibration curves for retinol and  $\alpha$ -tocopherol.

Liquid–liquid extraction of vitamin D metabolites in combination with Diels–Alder derivatization using the commercially available reagent 4-phenyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione (PTAD) followed by UPLC–electrospray ionization/tandem MS provided rapid and simultaneous quantification of vitamin D and 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> in raw and heat-treated DHM samples (Aronov *et al.*, 2008).

### VIII. 2. 7. Statistical analysis

Normality of data distribution was tested through histograms and Saphiro-Wilks tests. Results were displayed as median and interquartile range (IQR) when data were not normally distributed and as mean and 95% confidence interval (95% CI) when they were. For comparisons, data were analyzed using one-way or multi-way ANOVA test and Tukey multiple comparison *post hoc* tests when they were normally distributed or Kruskal-Wallis test and Nemenyi *post hoc* tests with Chi-squared



approximation for pairwise comparisons when they were not. Significance was set at  $p < 0.05$ . Pearson's correlation coefficient test was applied to compare the lactose concentration values obtained by mid-IR analysis (milk analyzer) and GC. The statistical software Statgraphics Centurion XVI version 16.1.15 (Statpoint Technologies Inc., Warrenton, Virginia, USA) and R 3.3.2 (R-project, <http://www.r-project.org>) were used to perform these analyses.

### VIII. 3. RESULTS

#### VIII. 3.1. Macronutrients

Analysis of gross macronutrient composition of DHM batches was performed by infrared spectrometry using an equipment specifically calibrated for human milk samples. The concentration of lactose in the 14 DHM production batches processed in this study ranged between 7.41 and 7.98 g/dL, being the most abundant macronutrient in DHM. The next most abundant macronutrients in DHM were fat and protein, which ranged from 2.83 to 3.98 g/dL and from 1.60 and 2.07 g/dL, respectively. (Figure 1). Low intersample variation was observed for protein (IQR=0.43 g/dL) and lactose (IQR=0.21 g/dL), while fat was the macronutrient showing the highest intersample variability (IQR=0.97 g/dL) (Figure 1).

Heat treatments, either HoP or any HTST processing, applied to DHM did not lead to statistically significant changes in lactose, fat or protein concentration (Kruskal Wallis tests,  $p=0.873$ ,  $p=0.992$ , and  $p=0.984$ , respectively).

#### VIII. 3.2. Carbohydrates

Minor carbohydrates present in DHM, such as glucose and *myo*-inositol were quantified using GC. The main minor carbohydrates found using this technique were glucose and *myo*-inositol, although lactose was also readily quantified with this technique. Mean (95% CI) values of glucose and *myo*-inositol concentration in DHM (10 production batches) before processing were 276.14 (230.66–317.07) mg/L and 228.31 (165.19–316.01) mg/L, respectively, while that of lactose was 65.78 (61.85–69.76) g/L (Figure 2). After HoP, the concentration of glucose [296.67 (279.43–313.91) mg/L] and *myo*-inositol [225.20 (203.14–247.25) mg/L] did not change, although mean lactose concentration increased by 7.00 ( $\pm 5.18$ ) g/L (one-way ANOVA,  $p=0.006$ ). Slight variations in the concentrations of glucose, *myo*-inositol and lactose were detected after HTST processing (Table 1) but they were not statistically significant (one-way ANOVA,  $p>0.05$ ) except for glucose concentration after HoP and also after HTST at 70°C for 25 s (one-way ANOVA,  $p=0.017$ ).

When the influence of temperature and time of treatment applied during HTST treatments was examined globally, only the effect of temperature had statistical significance (two-way ANOVA,  $p=0.027$  for glucose,  $p=0.001$  for *myo*-inositol, and  $p=0.017$  for lactose), although the change was different depending on the compound. Then, while the lactose concentration decreased when the temperature of treatment increased, *myo*-inositol concentration showed an increase at the same conditions.

There was no correlation between milk lactose concentration levels determined using a milk analyzer (Figure 1) and those obtained using a more specific chromatographic method (Table 1) ( $r=0.237$ ,  $p=0.104$ ).

### VIII. 3.3. Lipid classes

The main lipid class detected in the lipid fraction of raw DHM was the TAG) which represented between 96.72 and 96.75% of the total lipids (Table 2). Diacylglycerides (DAG) were the second most abundant class and accounted for only 2.63-2.73%. Other classes represented less than 0.5% of total lipids and they included cholesterol plus free FA (0.31-0.36%), monoacylglycerides (MAG) (0.08-0.10%), polar lipids (0.05-0.06%), and cholesteryl esters (0.03-0.05%). When DHM was treated in the HTST system, the proportion of TAG decreased while that of DAG increased; this change was statistically significant at 70°C ( $p=0.000$ ) but not at 72 or 75°C ( $p>0.05$ ) (Table 2).

The polar lipid fraction remained estable after HoP, but increased between 2- and 2.5-fold when DHM was subjected to any HTST treatment (Table 2). The concentration of major [sphingomyelin (32.75-37.95%), phosphatidylethanolamine (28.39-28.88%), and phosphatidylcholine (26.94-27.98%)] and minor [phosphatidylserine (4.71-6.35%) and phosphatidylinositol (2.70-3.63%)] polar lipids detected in raw DHM did not vary significantly after heat treatment.

### VIII. 3.4. FA profile

A detailed analysis of the effect of the heat treatments on the FA profile was performed for all DHM batches ( $n=10$ ). The FA composition of raw DHM is summarized in Table 3. Both saturated FAs (SFAs) and monounsaturated FAs (MUFAs) were in higher proportion (43% and 38%, respectively) than PUFAs (17%) among total milk FAs. The most abundant individual FAs were the MUFA oleic acid (C18:1 *trans*9) present at 36%, the SFA palmitic acid (C16:0) at 23%, and the PUFA n-6 linoleic acid (C18:2 *cis,cis*-9,12) at 16%. Other PUFAs found in DHM at lower amount were  $\alpha$ -linolenic acid (C18:3 all-*cis*-9,12,1; 0.22%), ARA (C20:4 all-*cis*-5,8,11,14; 0.18%), and DHA (C22:6 all-*cis*-4,7,10,13,16,19; 0.07%) (Table 3).

The effect of heat treatments in total SFAs, MUFAs and PUFAs is shown in Table 4. Globally, any HTST treatment increased slightly the proportion of PUFAs in DHM but the change was statistically significant only at 72°C, for both n-3 PUFAs (one-way ANOVA,  $p=0.038$ ) and n-6 PUFAs (one-way ANOVA,  $p=0.000$ ), and at 75°C for n-3 PUFAs (one-way ANOVA,  $p=0.010$ ) (Table 4). The highest change recorded was for n-3 PUFAs that increased from 0.22 (0.14-0.30)% of total FAs in raw DHM to 0.54 (0.46-0.63)% in HTST (at 75°C for 20 s). In contrast, the mean values of the proportion of SFAs, MUFAs, and PUFAs in DHM were not affected by HoP (Table 4).

The effect of heat treatments in individual FAs is summarized in Figure 3 while a more detailed information is presented in Table S1 (for SFAs), Table S2 (for MUFAs), and Table S3 (for PUFAs). Significant differences in the composition of

DHM after HTST treatment were observed for the following FAs: lauric acid (C12:0), palmitic acid (C16:0), margaric acid (C17:0), arachidic acid (C20:0), vaccenic acid (C18:1 *cis*-11), *cis*-vaccenic acid (C18:1 *trans*-11), linoleic acid (C18:2),  $\gamma$ -linolenic acid (C20:3), CLA (mixture of C20:2 isomers), ARA (C20:4),  $\alpha$ -linolenic acid (C18:3), and DHA (C22:6). The change was usually an increase in the proportion of the FAs, except for lauric and palmitic acids, where there was a decrease (Figure 3).

### VIII. 3.5. Activity of BSSL

Medium (IQR) concentration value of BSSL activity in raw DHM batches (n=8) was 9.21 (8.31–10.21) U/mL. Heat treatments, both HoP and HTST at 70°C (n=4) and 72°C (n=4) for 5, 15 and 25 s, significantly reduced BSSL activity in DHM. Retention rates of BSSL activity oscillated between 5 and 10% after HoP but were higher (15-20%) after HTST treatments (Figure 4). No significant differences were found neither regarding temperature and time for HTST processing (two-way ANOVA,  $p>0.05$ ) nor between HTST treatments and HoP (Kruskal Wallis test,  $p=0.087$ ).

### VIII. 3.6. Vitamins

The content of the most relevant vitamins in human milk was determined in a total of five batches of DHM before and after HTST treatments (one batch was processed at 70°C, two batches at 72°C, and two batches at 75°C) or HoP pasteurization. B complex vitamins thiamin, riboflavin/flavin adenine dinucleotide, nicotinamide and pyridoxal were quantified by UPLC coupled with MS detection. Among water-soluble vitamins, nicotinamide was the most abundant in raw DHM with a mean concentration of 501.80 (429.49–574.11)  $\mu\text{g/L}$ , followed by riboflavin/flavin adenine dinucleotide which had a mean concentration of 402.3 (335.25–469.35)  $\mu\text{g/L}$  (Table 5). Levels of pyridoxal and thiamine were lower, with mean values of 91.02 (81.78–100.26)  $\mu\text{g/L}$  and 22.18 (18.03–26.33)  $\mu\text{g/L}$ , respectively. The concentration of these vitamins showed a considerable sample-to-sample variation (Figure 5). A strong negative correlation was found between riboflavin and nicotinamide concentration in DHM raw milk ( $r=-0.951$ ,  $p=0.013$ ). Changes in water-soluble vitamins concentration after heat treatments of DHM samples were not statistically significant (one way ANOVA,  $p>0.05$ ) (Table 6).

Fat-soluble vitamins were analyzed using HPLC coupled with fluorescence detection. Raw DHM contained 3.81 (3.49–4.13) mg/L of  $\alpha$ -tocopherol, 0.48 (0.45–0.50) mg/L of  $\gamma$ -tocopherol, and 0.44 (0.41–0.46) mg/L of vitamin A (Table 7). Vitamin D and 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> were scarce and their mean concentrations were 84.95 (53.72–116.19)  $\mu\text{g/L}$  and 26.65 (17.69–35.60)  $\mu\text{g/L}$ , respectively. Similarly to water-soluble vitamins, a wide sample-to-sample variation was also noted for fat-soluble vitamins (Figure 6). Although the number of samples assayed was relatively

low, it was observed that  $\gamma$ -tocopherol and vitamin D concentrations increased with the temperature applied during HTST treatment while the length of treatment did not have any effect (two-way ANOVA,  $p < 0.05$ ). Minor variations in the levels of fat-soluble vitamins after heat treatments of DHM samples were not statistically significant (one-way ANOVA,  $p > 0.05$ ) (Table 8).

## VIII. 4. DISCUSSION

In this work the changes in DHM nutrient concentration after HTST treatment in a HMB-operative equipment were evaluated and compared to that registered after a conventional HoP method. Overall, relevant undesirable changes were not found neither in the main macronutrients (fat, lactose and protein) nor in some minor components such as glucose, *myo*-inositol, relevant FAs, and vitamins.

Preterm infants have complex nutrient requirements to cope with their high metabolic rate, growth, and immunological and cognitive development, among others, in order to achieve growth and body composition similar to the fetus of the same age. OMM is the recommended feeding in order to provide the required nutrients for both term and preterm infants (Agostoni *et al.*, 2010). Donor milk has been assumed to confer health advantages similar to those related by OMM in particular for preterm infants (ESPGHAN *et al.*, 2013).

Total fat, protein and lactose contents in DHM measured by FTIR and reported in this study (2.83-3.98 g/dL for fat, 1.60-2.07 g/dL for protein, and 7.41-7.98 g/dL for lactose) are in agreement with literature values reported by other authors (Ballard and Morrow, 2013; Martin *et al.*, 2016). Milk fat supplies between 40 and 55% of the total energy provided by human milk, being the most elemental nutrient for the infant (Koletzko, 2016). In addition, lipids are fundamental for cell membranes and their metabolism generates many bioactive lipid compounds that play a key role as mediators of signaling pathways (Koletzko, 2016). In general, DHM composition is close to fresh human milk with the exception of the fat content. DHM fat content is lower than in fresh expressed human milk (3.5-4.5%) (Martin *et al.*, 2016). This has been related to the strong adherence of milk fat to container surfaces because human milk is not homogenized and it is transferred several times during manipulation at home and HMB (Maffei and Schandler, 2017). Furthermore, ice and fat crystals formed during freezing may rupture the fat globule membrane and liberate fat that sticks easily to plastic surfaces, as mentioned above (Arnold, 2010; Vázquez-Roman *et al.*, 2014). Reduction of DHM fat content is important because premature infants have high energy requirements not only for growth but also for temperature regulation and other metabolic stressors. This highlights the need of personalized nutrition management, analyzing individually the nutrient and energy content of any feeding, either OMM or DHM, in order to determine the convenience of fortification to ensure optimal growth and body composition in preterm infants (Brennan *et al.*, 2016; Wojcik *et al.*, 2009).

Lactose is the macronutrient that provides the second most important source of energy of human milk. It is hydrolyzed to glucose and galactose by the lactase present on the brush border at the small intestine, being the glucose the main circulating carbohydrate and primary source of energy for the brain in preterm infant (Agostoni *et*

*al.*, 2010). Although lactase activity increases rapidly postnatally, it is low in preterm infants (Kien, 1990). Impairment in lactose digestion and absorption may favor the development of necrotizing enterocolitis (NEC) in preterms, which has been related to a dysbiosis in the immature intestine of the preterm (Kien, 2006; Neu and Pammi, 2017). However, the protection of the premature infant against NEC provided by human milk is probably related to several factors such as SIgAs, lactoferrin, lysozyme, BSSL, growth factors, HMOs, immune cells and microbiota (Neu and Pammi, 2017; Underwood, 2013). Improved feeding tolerance has been associated to trophic feeding, defined as the administration of very small volumes of OMM or DHM to infants, because it stimulates gut maturation and motility, induces lactase activity, among others, and promotes gut hormone release (McClure and Newell, 2002; Patole, 2005).

Milk proteins provide amino acids as building blocks for protein synthesis but also display antimicrobial and immunomodulatory functions and stimulate the absorption of nutrients (Martin *et al.*, 2016). Protein content of human milk decreases over the first 4 to 6 weeks and/or in mothers producing high amounts of milk (Ballard and Morrow, 2013). For these reasons DHM, which usually corresponds with term milk and is donated by women during an established lactation and producing abundant milk, has unsufficient protein concentration for feeding preterm infants that require 3.5-4 g of protein/kg daily (Hay and Thureen, 2010). In fact, protein supplementation improves short-term growth as well as long-term neurodevelopmental outcomes in preterms (Schanler, 2011).

Several studies have addressed the effect of HoP on milk macronutrients, showing no changes on the protein and lactose (de Segura *et al.*, 2012; Espinosa-Martos *et al.*, 2013; García-Lara *et al.*, 2013; Goes *et al.*, 2002; Silvestre, 2006) and a significant reduction in total fat content (García-Lara *et al.*, 2013; Vieira *et al.*, 2011) in DHM. Other authors did not observe any significant change in fat levels (Fidler *et al.*, 2001; Goes *et al.*, 2002; Henderson *et al.*, 1998; Lepri *et al.*, 1997). Discrepancies could be related to the technique used for sample preparation before analysis or the analytical technique itself. In this study the global content in macronutrients in DHM using a mid-IR analyzer did not show statistically significant changes regarding protein, fat, or lactose after HoP or HTST treatment of DHM samples.

Mid-IR analyzers are commonly used in the dairy industry because carbon-hydrogen, amide, and hydroxyl groups absorb mid-IR energy at different wavelengths (3.48  $\mu\text{m}$ , 6.465  $\mu\text{m}$ , and 9.610  $\mu\text{m}$ , respectively) and they are the main functional groups representatives of milk fat, protein, and lactose, respectively (Lefier *et al.*, 1996). When IR analyzers equipments, that were originally developed for dairy industry, are applied for the analysis of human milk they should be validated due to differences in the proportion of caseins/total protein and HMO/lactose, and in fatty

acid profiles (Fusch *et al.*, 2015), as it was the case for the milk analyzer used in this study.

Differences between the lactose concentrations in raw milk samples measured by the mid-IR analyzer (7.65 g/dL) and by GC (6.55 g/dL) may be related to the inclusion of non-lactose carbohydrates (HMOs) in the first measurements. In fact, it was confirmed that purified HMOs absorbed in the same mid-IR spectral region as lactose (data not shown). HMOs are easily identified by MS and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, but these technologies are not easily adapted to the clinical setting. In contrast mid-IR spectrophotometry is suitable for this purpose due to the small volume of sample required and the fast analysis time. In addition, FTIR generates the whole mid-IR spectrum and has the potential to develop algorithms that would allow to calculate the concentration of other components, such as HMO, if adequate sensitive wavelength regions are identified; MS and NMR could be used as validation tools increasing the future clinical value of FTIR (Fusch *et al.*, 2015; Smilowitz *et al.*, 2014). HMO concentration in human milk varies across lactation and decreases from about 23 g/L in colostrum to 7 g/L in mature milk (Bode, 2015). HMOs shape the gut microbiota of the neonate and protect against NEC, candidiasis, and other immune-related diseases. Unfortunately, current feeding practices at NICUs do not consider the intake of this bioactive component (Moukarzel and Bode, 2016). The HMO composition in milk from mothers delivering prematurely shows low and highly variable content of fucosylated HMOs that has been related to increased susceptibility to intestinal dysbiosis and greater risk for infections in premature infants. DHM protective effect in preterms may be explained partially by stable concentrations found in term milk together with the heat resistance of HMOs (Daniels *et al.*, 2017; De Leoz *et al.*, 2012).

The concentration of *myo*-inositol in DHM human milk after HoP did not change, as it had been found in previous studies (de Segura *et al.*, 2012). This sugar alcohol is strongly demanded by neonatal tissues, such as skeletal muscle and epidermis. It is also found in high levels in neonatal blood and is the main metabolite present in neonatal brain, as summarized by Jóźwik *et al.* (2013). *myo*-Inositol concentration changes exponentially after the first four days after delivery and it stabilizes afterwards at ~243 mg/L (1,350  $\mu$ M) de Segura *et al.*, 2012; Jóźwik *et al.*, 2013; Moles *et al.*, 2015). Therefore, *myo*-inositol concentration in DHM whose composition corresponds to mature milk is probably scarce to fulfill the preterm requirements.

The main lipid fraction found in DHM was TAG, representing ~97% of total lipids. Changes in TAG and DAG during HTST treatment at 70°C may indicate partial hydrolysis of TAG as it has been suggested by other authors (Lepri *et al.*, 1997). However, freezing and thawing of DHM cause greater hydrolysis of TAG than pasteurization (Wardell *et al.*, 1981).



The impact of HoP on FA profile was been studied repeatedly and almost unanimously they concluded that milk FA content was unaffected by HoP (Borgo *et al.*, 2015; Delgado *et al.*, 2014; Fidler *et al.*, 2001; Henderson *et al.*, 1998; Romeu-Nadal *et al.*, 2008; Valentine *et al.*, 2010). However, others have found slight changes in the proportion of total SFAs (increase) and MUFAs (decrease) (Ewaschuck *et al.*, 2011), or a small decrease in linoleic (C18:2) and  $\alpha$ -linolenic (C18:3) acids (Wardell *et al.*, 1981). In examining individual FAs in this study, it was noticed that most LC FAs (SFAs, MUFAs, and PUFAs) displayed increased concentrations in heat treated DHM increased when compared to raw DHM.

It is known that heat treatments ( $>70^{\circ}\text{C}$ ) denature membrane proteins in the milk fat globule reducing their stability and, together with freeze-thawing, favors milk lypolysis and the release of lipids into the aqueous phase (Fidler *et al.*, 2001). The increase in FAs following the heat treatment of DHM should be considered desirable because free FAs are readily absorbed in the gut and, therefore, the nutritional value of DHM is improved (de Oliveira, 2017; Lepri *et al.*, 1997). This is relevant as preterm infants have reduced pancreatic and lingual lipase activities as well as the bile pool and milk BSSL is inactivated at relatively low temperatures ( $45\text{--}55^{\circ}\text{C}$ ) (Tudehope, 2013; Wardell *et al.*, 1981). Human milk BSSL increases fat absorption in preterm infants because it enhances lypolysis, but BSSL activity is completely lost after HoP (Baro *et al.*, 2011; Williamson *et al.*, 1978). Higher BSSL activity remained in HTST-treated DHM compared to HoP-DHM, although the difference was not statistically significant in agreement with other authors (Giribaldi *et al.*, 2016).

Among all milk FAs, the provision of LC-PUFAs ARA and DHA by human milk has received more interest due to their high accretion in the infant brain and their impact on membrane function, eicosanoid and docosaesanoïd synthesis, and consequently on the regulation of physiological processes, and the development and function of neural and immune tissues (Koletzko, 2016). However, human milk content of LC-PUFA DHA is not regulated by the mammary gland; it depends on the concentration of this FA in maternal plasma lipids that depends, in turn, on the maternal diet. Therefore, it is recommended that breastfeeding women should get  $>200$  mg DHA/day to achieve a DHA content in milk of at least  $\sim 0.3\%$  of FAs (Koletzko *et al.*, 2014). In consequence, DHA content in breastmilk varies significantly among individual mothers, but pooling donor milk would limit variations from batch to batch over time. In contrast, most of LC-PUFA ARA present in human milk derives from maternal ARA body stores rather than from absorbed dietary lipids (Del Prado *et al.*, 2001). In addition, as neither HoP nor HTST treatments affect adversely DHA and ARA content in human milk, pasteurized DHM probably contains a consistent quantity of LC-PUFAs (Baack *et al.*, 2012). Given the growing body of evidence about the importance of LC-PUFAs in neonates, the addition of an equilibrated DHA/ARA supplementation to DHM milk should be further studied to support the overall health and neurodevelopment of this at risk population.

In this work, the effect of heat treatments on selected vitamins was also examined. Vitamins are micronutrients essential for growth and development; some are required for correct weight and length growth (folic acid, vitamin A, pyridoxine), others are important for brain development and growth (folate, vitamin A), while others are essential for bone mineralization (vitamin D) (Martin *et al.*, 2016).

HoP and HTST treatments did not modify substantially the concentrations of either B complex vitamins (thiamin, riboflavin, nicotinamide, and pyridoxal) or several fat-soluble vitamins (A, E, including  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherol, D<sub>3</sub> and 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>) in DHM. However, preterm infants, who have very high nutrient requirements and limited nutrient stores, usually receive fortifiers that contain proteins and a complex mix of vitamins and minerals or specific vitamin supplements (Underwood, 2016).

Micronutrient supplementation may favor optimal growth in extremely preterm infants, as it has been shown for folate (Sjöström *et al.*, 2016). But it should be personally optimized and carefully monitored as an excess may be associated with toxicity. Vitamin D is of particular concern in preterm infants because human milk is an inadequate source of this vitamin, as well as of calcium and phosphorus. Vitamin D is a key modulator of calcium and bone metabolism and it is also involved in innate immune system and neuromuscular functions (Holick, 2007). Therefore, preterm neonates are at risk for metabolic bone disease due to inadequate intake of vitamin D, calcium, and phosphorus. In fact, this condition is present in ~50% of extremely low birth weight infants and ~25% of very low weight infants (Bathia, 2013). Currently there is no consensus regarding the most adequate dose of vitamin D supplementation for preterms, combined with uncertainty about the consequences of different recommended doses (from 200 to 1000 IU/day) and lack of information about the safety in very low-birth weight infants (Kołodziejczyk and Borszewska-Kornacka, 2015; Natarajan *et al.*, 2014). Hypervitaminosis D may occur due to excessive milk fortification and, although rare, some intoxication cases have been described (Nako *et al.*, 2004; Vogiati *et al.*, 2014).

Similarly, preterms have a low serum and whole-body level of tocopherol at birth, which is related in part to their low body fat stores, but they require a greater supply of antioxidants because they are exposed to higher oxidative stress due to infections, oxygen, mechanical ventilation, and intravenous nutrition (Lima *et al.*, 2014). There is no consensus about the adequate vitamin E intake, and the recommended daily vitamin E dose has been established at 2.8 mg/kg daily (Greene *et al.*, 1988). In very low-weight and preterm infants vitamin E supplementation reduces the risk of retinopathy and intracranial hemorrhage, respectively, but in both groups of infants excessive doses of this vitamin may increase the risk of sepsis (Brion and Raghuvier, 2003). Therefore, this is another example of the complex relationship between nutrient intake and function, that does not follow a simple linear relationship but a U-shaped curve, which could be more complex if genomics and interactions with

other nutrients are considered, indicating that for many nutrients both a deficiency and an excess can have pathological effects (Binns and Low, 2014).

It is puzzling that micronutrient requirements are not well established for preterm infants. Lack of appropriate techniques, which do not involve laborious sample processing, long time of analysis and/or high sample volume, may explain the scarce data regarding requirements of these compounds. For water-soluble vitamins, a recently developed UPLC-MS/MS technique allows to detect simultaneously several vitamins of this class in a short period of time (Hampel *et al.*, 2012).

In summary, this is the first study that explores the effect in DHM of a HTST treatment performed in a system operating in a HMB. Overall, the results obtained in this study suggest that HTST processing preserves the nutritional quality of DHM. However, DHM usually corresponds to mature milk which differs in composition from that produced by mothers of preterm infants. And these low weight infants have high nutritional requirements that should be considered individually based on infant growth control in order to design the most optimal feeding for them.

## VIII. 5. REFERENCES

- Agostoni C, Buonocore G, Carnielli VP, De Curtis M, Darmaun D, et al. Enteral nutrient supply for preterm infants: commentary from the European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010; 50:85–91.
- Arnold LDW. Human milk in the NICU. Policy into practice. Jones and Bartlett Publishers, LLC; Sudbury, Massachusetts, USA. 2010.
- Aronov PA, Hall LM, Dettmer K, Stephensen CB, Hammock BD. Metabolic profiling of major vitamin D metabolites using Diels-Alder derivatization and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2008; 391:1917–30.
- ESPGHAN, Arslanoglu S, Corpeleijn W, Moro G, Braegger C, et al. Donor human milk for preterm infants: Current evidence and research directions. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2013; 57:535–42.
- Baack ML, Norris AW, Yao J, Colaizy T. Long-chain polyunsaturated fatty acid levels in US donor human milk: meeting the needs of premature infants? *J Perinatol.* 2012; 32:598–603.
- Ballard O, Morrow AL. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatr Clin North Am.* 2013; 60:49–74.
- Baro C, Giribaldi M, Arslanoglu S, et al. Effect of two pasteurization methods on the protein content of human milk. *Front Biosci (Elite Ed).* 2011; 3:818–29.
- Bathia J. Leche humana y el neonato prematuro. *Ann Nutr Metab.* 2013; 62:8–14.
- Bertino E, Coppa GV, Giuliani F, Coscia A, Gabrielli O, et al. Effects of Holder pasteurization on human milk oligosaccharides. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2008; 21:381–5.
- Binns C, Low WY. Nutrition in the 21st century: Riding the U-shaped wave. *Asia-Pac J Public Health/Asia-Pac Acad Consort Public Health.* 2014; 26: 444–6.
- Bode L. The functional biology of human milk oligosaccharides, *Early Human Dev.* 2015; 91:619–22.
- Borgo LA, Cohelho Araujo WM, Conceição MH, Sabioni Resck I, Mendonça MA. Are fat acids of human milk impacted by pasteurization and freezing? *Nutr Hosp.* 2015; 31:1386–93.
- Brenna JT, Varamini B, Jensen RG, Diersen Schade DA, Boettcher JA, et al. Docosahexaenoic and arachidonic acid concentrations in human breast milk world-wide. *Am J Clin Nutr.* 2007; 85:1457–64.
- Brennan AM, Murphy BP, Kiely ME. Optimising preterm nutrition: present and future. *Proc Nutr Soc.* 2016; 75:154–61.

- Brion LP, Bell EF, Raghuveer TS. Vitamin E supplementation for prevention of morbidity and mortality in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2003; 4.
- Castro-Gómez P, Montero O, Fontecha J. In-depth lipidomic analysis of molecular species of triacylglycerides, diacylglycerides, glycerophospholipids, and sphingolipids of buttermilk by GC-MS/FID, HPLC-ELSD, and UPLC-QToF-MS. *Int J Mol Sci*. 2017; 18.
- Castro-Gómez P, Rodríguez-Alcalá LM, Monteiro KM, Ruiz AL, Carvalho JE, Fontecha J. Antiproliferative activity of buttermilk lipid fractions isolated using food grade and non-food grade solvents on human cancer cell lines. *Food Chem*. 2016; 212:695–702.
- Castro-Gómez P, Garcia-Serrano A, Visioli F, Fontecha J. Relevance of dietary glycerophospholipids and sphingolipids to human health. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2015; 101:41–51.
- Castro-Gómez P, Fontecha J, Rodríguez-Alcalá LM. A high-performance direct transmethylation method for total fatty acids assessment in biological and foodstuff samples. *Talanta*. 2014; 128:518–23.
- Christie WW. Gas chromatography and lipids, a practical guide. *The Oily Press, Ayr, Scotland*. 1990.
- Daniels B, Coutoudis A, Autran C, Amundson Mansen K, Israel-Ballard K, Bode L. The effect of simulated flash heating pasteurisation and holder pasteurisation on human milk oligosaccharides. *Paediatr Int Child Health*. 2017; 6:1–6.
- De Leoz MLA, Gaerlan SC, Strum JS, et al. Lacto-N-tetraose, fucosylation, and secretor status are highly variable in human milk oligosaccharides from women delivering preterm. *J Proteome Res*. 2012; 11:4662–72.
- de Oliveira SC, Bellanger A, Ménard O, Pladys P, Le Gouar Y, et al. Impact of human milk pasteurization on gastric digestion in preterm infants: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*. 2017; 105:379–90.
- de Segura AG, Escuder D, Montilla A, Bustos G, Pallás C, et al. Heating-induced bacteriological and biochemical modifications in human donor milk after Holder pasteurisation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012; 54:197–203.
- Del Prado M, Villalpando S, Elizondo A, Rodriguez M, Demmelmair H, et al. Contribution of dietary and newly formed arachidonic acid to human milk lipids in women eating a low-fat diet. *Am J Clin Nutr*. 2001; 74:242–7.
- Delgado FJ, Cava R, Delgado J, Ramírez R. Tocopherols, fatty acids and cytokines content of Holder pasteurised and high-pressure processed human milk. *Dairy Sci Technol*. 2014; 94:145–56.

- Delplanque B, Gibson R, Koletzko B, Lapil lonne A, Strandvik B. Lipid quality in infant nutrition: current knowledge and future opportunities. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2015; 61:8–17.
- Dritsakou K, Liosis G, Valsami G, Polychronopoulos E, Skouroliahou M. The impact of maternal and neonatal associated factors on human milk's macronutrients and energy. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2016; 2:1–7.
- Espinosa-Martos I, Montilla A, de Segura AG, Escuder D, Bustos G, et al. Bacteriological, biochemical, and immunological modifications in human colostrum after Holder pasteurisation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2013; 56:560–8.
- Escuder D. 2017. Design, operation and optimization of a HTST system for pasteurization of donor human milk in a human milk bank setting (Section VI). In *Calidad de la leche donada durante el procesamiento en un Banco de Leche Humana. Innovación en los procedimientos* (Unpublished PhD thesis). Universidad Complutense de Madrid, Spain.
- Ewaschuk JB, Unger S, O'Connor DL, Stone D, Harvey S, et al. Effect of pasteurization on selected immune components of donated human breast milk. *J Perinatol.* 2011; 31:593–8.
- Fidler N, Sauerwald TU, Demmelmair H, Koletzko B. Fat content and fatty acid composition of fresh, pasteurized, or sterilized human milk. *Adv Exp Med Biol.* 2001; 501:485–95.
- Fusch G, Rochow N, Choi A, Fusch S, Poeschl S, Ubah AO, Lee SY, Raja P, Fusch C. Rapid measurement of macronutrients in breast milk: How reliable are infrared milk analyzers? *Clin Nutr.* 2015; 34:465–76.
- García-Lara NR, Vieco DE, De la Cruz-Bértolo J, Lora-Pablos D, Velasco NU, et al. Effect of Holder pasteurization and frozen storage on macronutrients and energy content of breast milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2013; 57:377–82.
- Giribaldi M, Coscia A, Peila C, et al. Pasteurization of human milk by a benchtop High Temperature Short-Time device. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2016; 36:228–33.
- Goelz R, Hihn E, Hamprecht K, et al. Effects of different CMV-heat-inactivation-methods on growth factors in human breast milk. *Pediatr Res.* 2009; 65:458–61.
- Goes HC, Torres AG, Donangelo CM, et al. Nutrient composition of banked human milk in Brazil and influence of processing on zinc distribution in milk fractions. *Nutrition.* 2002; 18:590–4.
- Greene HL, Hambidge M, Schanler R, Tsang RC. Guidelines for the use of vitamins, trace elements, calcium, magnesium, and phosphorus in infants and children receiving total parenteral nutrition: report of the Subcommittee on Pediatric

- Parenteral Nutrient Requirements from the Committee on Clinical Practice Issues of the American Society for Clinical Nutrition. *Am J Clin Nutr.* 1988; 48:1324–42.
- Hampel D, Shahab-Ferdows S, Islam MM, Peerson JM, Allen LH. Vitamin concentrations in human milk vary with time within feed, circadian rhythm, and single-dose supplementation. *J Nutr.* 2017; 147:603–11.
- Hampel D, York ER, Allen LH. Ultra-performance liquid chromatography tandem mass-spectrometry (UPLC-MS/MS) for the rapid, simultaneous analysis of thiamin, riboflavin, flavin adenine dinucleotide, nicotinamide and pyridoxal in human milk. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2012; 903:7–13.
- Hay WW, Thureen P. Protein for preterm infants: how much is needed? How much is enough? How much is too much? *Pediatr Neonatol.* 2010; 51:198–207.
- Henderson TR., Fay TN, Hamosh M. Effect of pasteurization on long chain polyunsaturated fatty acid levels and enzyme activities of human milk. *J Pediatr.* 1998; 132:876–8.
- Hernell O, Bläckberg L. Human milk bile salt-stimulated lipase: functional and molecular aspects. *J Pediatr.* 1994; 125:S56–61.
- Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med.* 2007; 357:266–81.
- Jóźwik M, Jóźwik M, Teng C, Jóźwik M, Battaglia FC. Human breast milk sugars and polyols over the first 10 puerperium days. *Am J Hum Biol.* 2013; 25:198–204.
- Kien CL. Colonic fermentation of carbohydrate in the premature infant: possible relevance to necrotizing enterocolitis. *J Pediatr.* 1990; 117:S52–8.
- Kien CL. Enteral carbohydrate assimilation. Chapter 22. In *Neonatal Nutrition and Metabolism*. 2<sup>nd</sup> ed. PJ Thureen and WW Hay (editors). Published by Cambridge University Press. 2006. p:340–9.
- Koletzko B, Boey CCM, Campoy C, Carlson SE, Chang N, et al. Current information and Asian perspectives on long-chain polyunsaturated fatty acids in pregnancy, lactation and infancy. Systematic review and practice recommendations from an Early Nutrition Academy workshop. *Ann Nutr Metab* 2014; 65:49–80.
- Koletzko B. Human milk lipids. *Ann Nutr Metab.* 2016; 69:28–40.
- Kołodziejczyk A, Borszewska-Kornacka MK. Monitored supplementation of vitamin D in preterm neonates-a primary report. *Dev Period Med.* 2015; 19:313–8.
- Lefier D, Grappin R, Pochet S. Determination of fat, protein, and lactose in raw milk by Fourier transform infrared spectroscopy and by analysis with a conventional filter-based milk analyzer. *J AOAC Int.* 1996; 79:711–7.

- Lepri L, Del Bubba M, Maggini R, Donzelli GP, Galvan P. Effect of pasteurization and storage on some components of pooled human milk. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1997; 704:1–10.
- Lima MS, Dimenstein R, Ribeiro KD. Vitamin E concentration in human milk and associated factors: a literature review. *J Pediatr (Rio J).* 2014; 90:440–8.
- Lönnerdal B. Bioactive proteins in human milk-potential benefits for preterm infants. *Clin Perinatol.* 2017; 44:179–91.
- Maffei D, Schanler RJ. Human milk is the feeding strategy to prevent necrotizing enterocolitis. *Semin Perinatol.* 2017; 41:36–40.
- Martin CR, Ling PR, Blackburn GL. Review of infant feeding: key features of breast milk and infant formula. *Nutrients.* 2016; 2016:8.
- McClure R, Newell S. Randomized controlled study of digestive enzyme activity following trophic feeding. *Acta Pædiatrica.* 2002; 91:292–6.
- Moles L, Manzano S, Fernández L, Montilla A, Corzo N, et al. Bacteriological, biochemical, and immunological properties of colostrum and mature milk from mothers of extremely preterm infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2015; 60:120–6.
- Montilla A, Moreno FJ, Olano A. A reliable gas capillary chromato-graphic determination of lactulose in dairy samples. *Chromatographia.* 2005; 62:311–4.
- Moukarzel S, Bode L. Human milk oligosaccharides and the preterm infant: a journey in sickness and in health. *Clin Perinatol.* 2016; 44:193–207.
- Nako Y, Tomomasa T, Morikawa A. Risk of hypervitaminosis D from prolonged feeding of high vitamin D premature infant formula. *Pediatr Int.* 2004; 46:439–43.
- Natarajan CK, Sankar MJ, Agarwal R, Pratap OT, Jain V, et al. Trial of daily vitamin D supplementation in preterm infants. *Pediatrics.* 2014; 133:e628–34.
- Neu J, Pammi M. Pathogenesis of NEC: Impact of an altered intestinal microbiome. *Semin Perinatol.* 2017; 41:29–35.
- Nommsen LA, Lovelady CA, Heinig MJ, Lonnerdal B, Dewey KG. Determinants of energy, protein, lipid, and lactose concentrations in human milk during the first 12 mo of lactation: the DARLING Study. *Am J Clin Nutr.* 1991; 53:457–65.
- Patole S. Strategies for prevention of feed intolerance in preterm neonates: a systematic review. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2005; 18:67–76.
- Peila C, Moro GE, Bertino E, et al. The effect of Holder pasteurization on nutrients and biologically-active components in donor human milk: a review. *Nutrients.* 2016; 8:477.

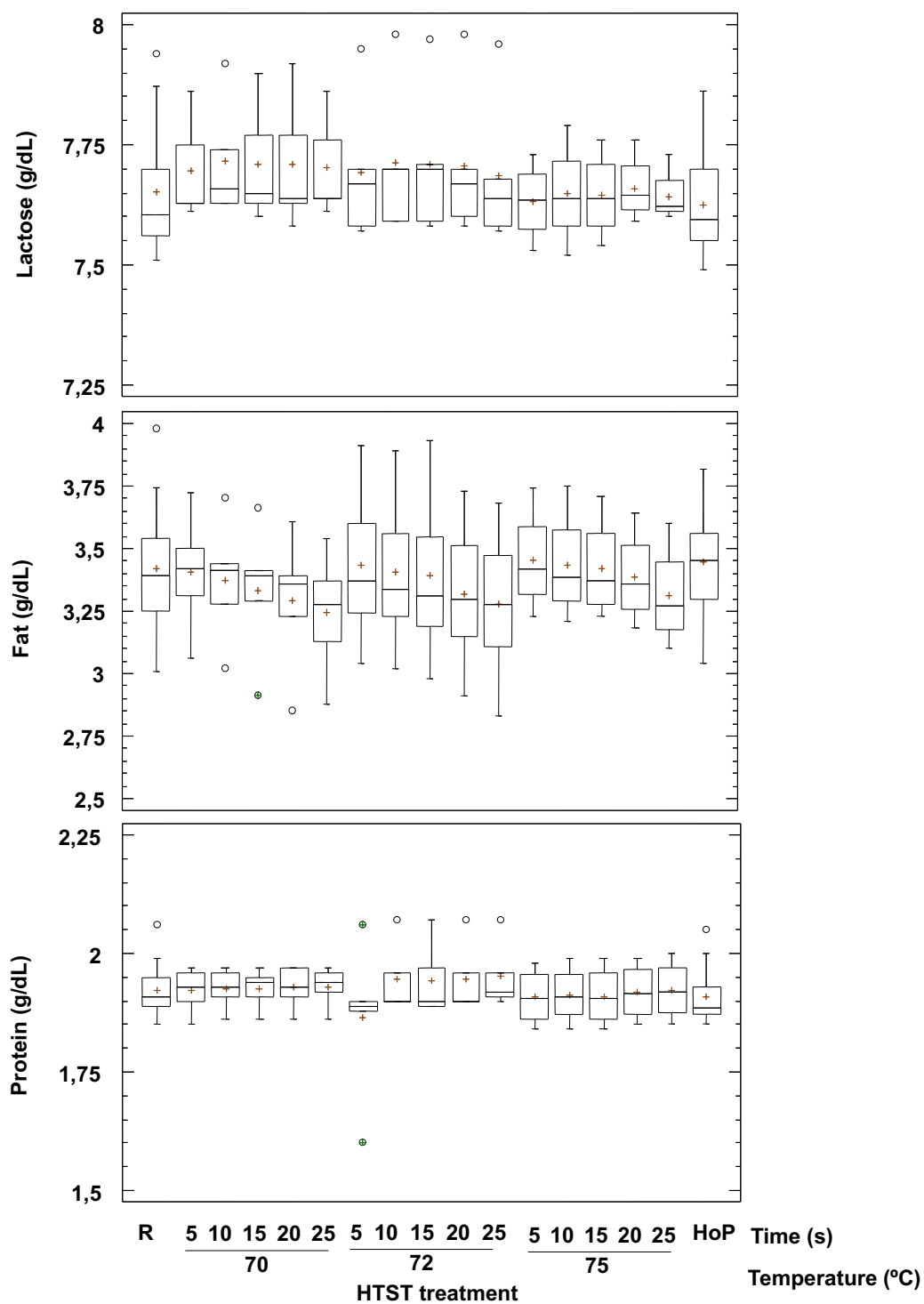


- Peila C, Emmerik NE, Giribaldi M, Stahl B, Ruitenberg JE, et al. Human milk processing: a systematic review of innovative techniques to ensure the safety and quality of donor milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2017; 64:353–36.
- Picaud JC, Buffin R. Human milk treatment and quality of banked human milk. *Clin Perinatol.* 2017; 44:95–119.
- Rodríguez-Alcalá LM, Harte, Fontecha J. Fatty acid profile and CLA isomers content of cow, ewe and goat milks processed by high pressure homogenization. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2009; 10:32–6.
- Romeu-Nadal M, Castellote AI, Gayà A, López-Sabater MC. Effect of pasteurisation on ascorbic acid, dehydroascorbic acid, tocopherols and fatty acids in pooled mature human milk. *Food Chem.* 2008; 107:434–8.
- Schanler RJ. Outcomes of human milk fed premature infants. *Semin Perinatol.* 2011; 35:29–33.
- Silvestre D, Ferrer E, Gayà J, Jareño E, Miranda M, Muriach M, Romero FJ. Available lysine content in human milk: stability during manipulation prior to ingestion. *Biofactors.* 2006; 26:71–9.
- Silvestre D, Miranda M, Muriach M, Almansa I, Jareno E, et al. Antioxidant capacity of human milk: effect of thermal conditions for the pasteurization. *Acta Paediatr.* 2008; 97:1070–4.
- Sjöström ES, Öhlund I, Ahlsson F, Domellöf M. Intakes of micronutrients are associated with early growth in extremely preterm infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2016; 62:885–92.
- Smilowitz JT, Ghosh DS, Mirmiran M, German JB, Underwood MA. Rapid measurement of human milk macronutrients in the neonatal intensive care unit: accuracy and precision of fourier transform mid-infrared spectroscopy. *J Hum Lact.* 2014; 30:180–9.
- Tudehope DI. Human milk and the nutritional needs of preterm infants. *J Pediatr.* 2013; 162:S17–25.
- Underwood MA. Human milk for the premature infant. *Pediatr Clin North Am.* 2013; 60:189–207.
- Underwood MA. Missed opportunities: The cost of suboptimal breast milk feeding in the neonatal intensive care unit. *J Pediatr.* 2016; 175:12–4.
- Valentine CJ, Morrow BS, Fernandez S, Gulati P, Bartholomew D, et al. Docosahexaenoic acid and amino acid contents in pasteurized donor milk are low for preterm infants. *J Pediatr.* 2010; 157:906–10.

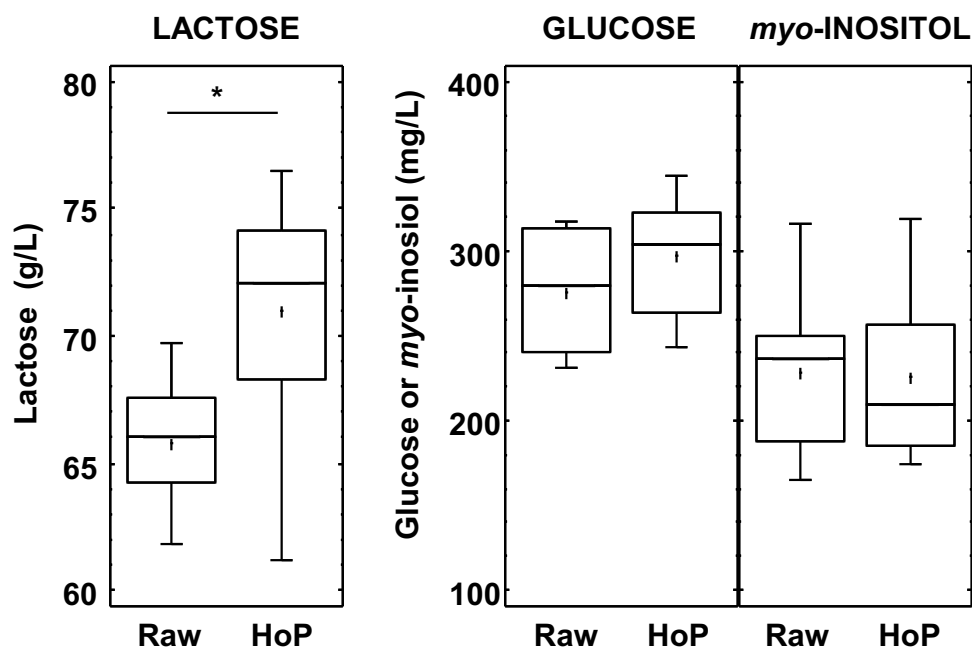
- Vázquez-Román S, Alonso-Díaz C, García-Lara NR, Escuder-Vieco D, Pallás-Alonso CR. Effect of freezing on the "creamatocrit" measurement of the lipid content of human donor milk. *An Pediatr (Barc)*. 2014; 81:185–8.
- Vieira AA, Soares FV, Pimenta HP, et al. Analysis of the influence of pasteurization, freezing/thawing, and offer processes on human milk's macronutrient concentrations. *Early Hum Dev*. 2011; 87:577–80.
- Vogiatzi MG, Jacobson-Dickman E, DeBoer MD. Drugs, and Therapeutics Committee of The Pediatric Endocrine Society. Vitamin D supplementation and risk of toxicity in pediatrics: a review of current literature. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014; 99:1132–41.
- Wardell JM, Hill CM, D'Souza SW. Effect of pasteurization and of freezing and thawing human milk on its triglyceride content. *Acta Paediatr Scand*. 1981; 70:467–71.
- Williamson S, Finucane E, Ellis H, et al. Effect of heat treatment of human milk on absorption of nitrogen, fat, sodium, calcium, and phosphorus by preterm infants. *Arch Dis Child*. 1978; 53:555–63.
- Wojcik KY, Rechtman DJ, Lee ML, Montoya A, Medo ET. Macronutrient analysis of a nationwide sample of donor breast milk. *J Am Diet Assoc*. 2009; 109:137–40.



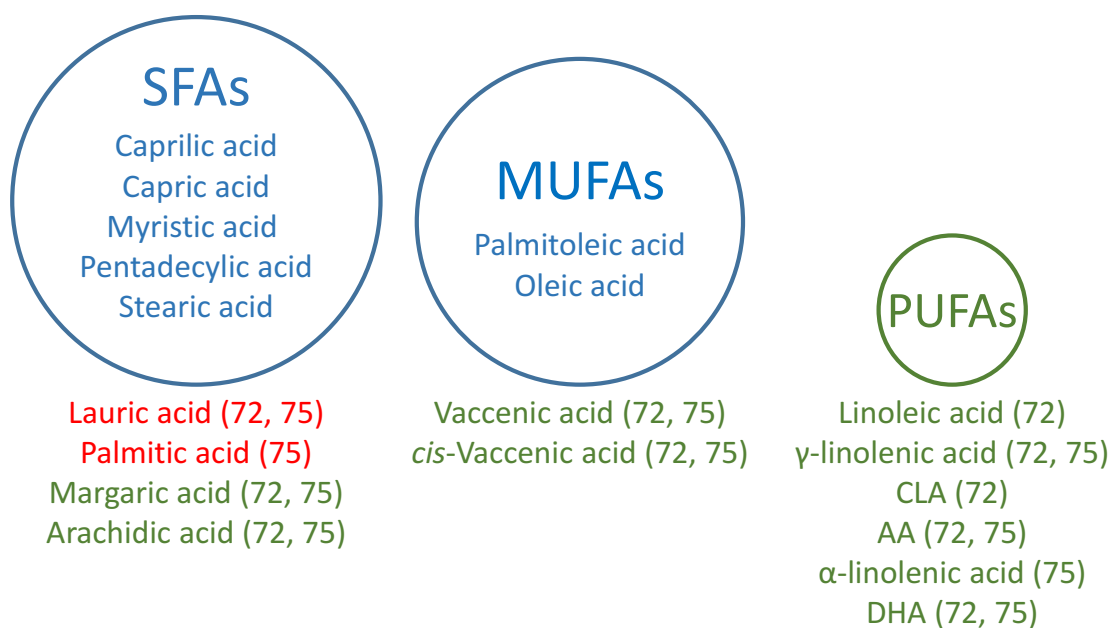
## VIII. 6. FIGURES



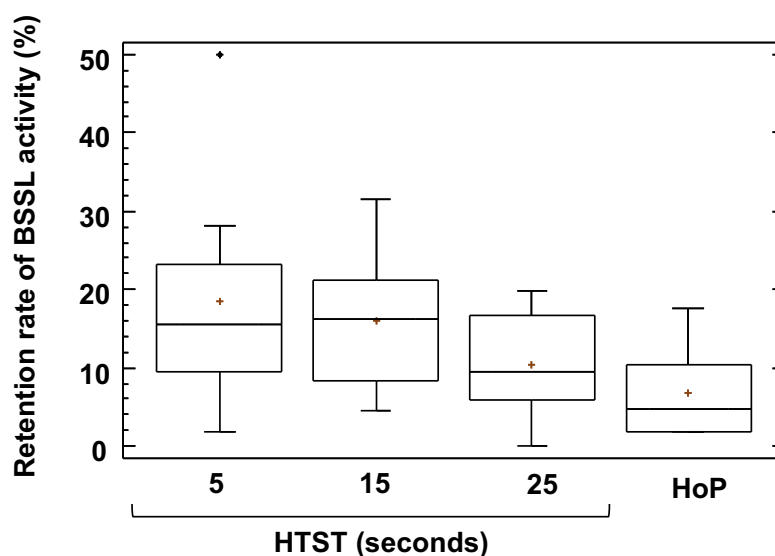
**Figure 1.** Concentrations of lactose, fat and protein in DHM before (R, n=14) and after Holder pasteurization (HoP, 62.5°C, 30 min, n=14) or HTST treatment at 70°C (n=5), 72°C (n=5) and 75°C (n=4) for 5, 10, 15, 20, and 25 seconds.



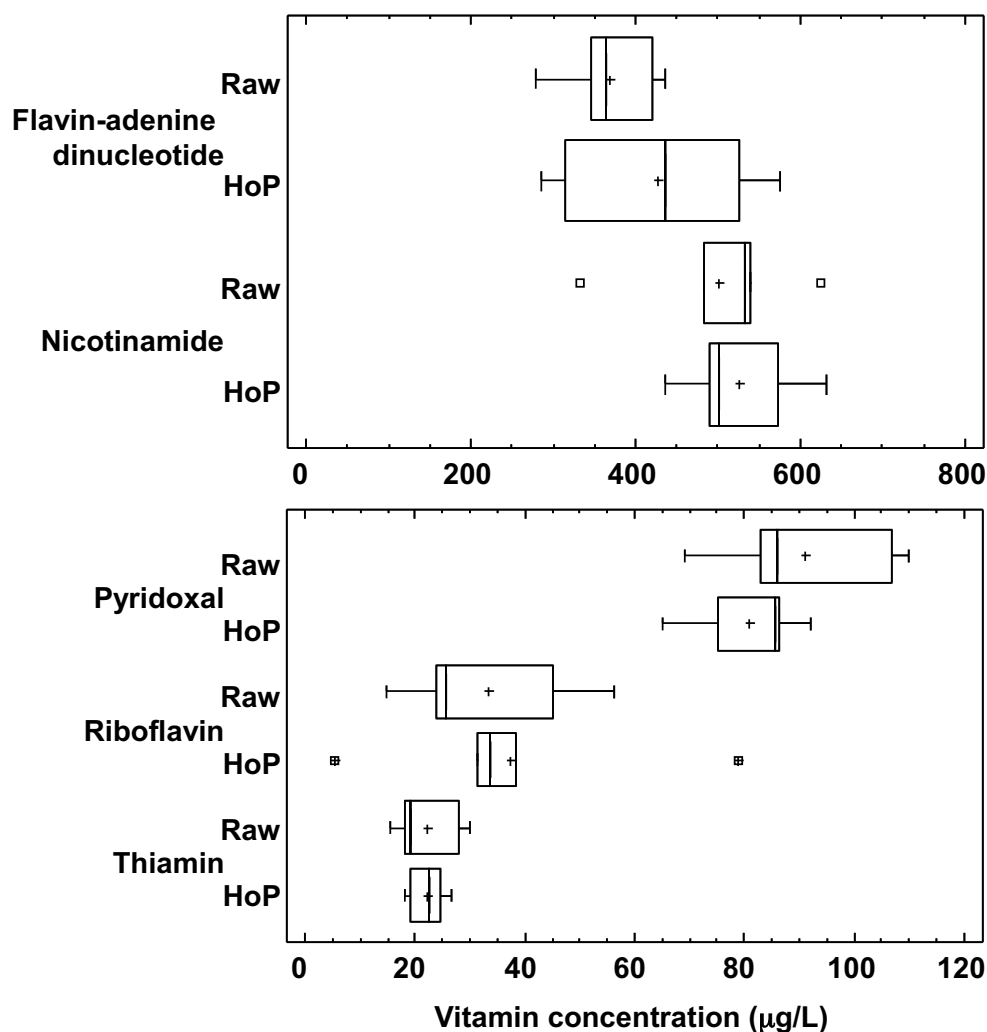
**Figure 2.** Boxplots showing the concentrations of lactose, glucose and *myo*-inositol in DHM samples (n=10) before (Raw) after Holder pasteurization (HoP, 62.5°C, 30 min). The height of the box indicates the interquartile range (3<sup>rd</sup> quartile–1<sup>st</sup> quartile), the horizontal line in the box bar represents the median concentration value and the cross represents the mean concentration value. No outliers were found. Differences in mean concentration values are indicated by an asterisk (one-way ANOVA,  $p=0.006$ ).



**Figure 3.** Changes in individual FAs observed after HTST treatment (specific temperature (72 or 75°C) is indicated in brackets) of DHM. FAs that did not change are in blue, those that decreased are in red, and those that increased are in green. The size of the circles represents the relative amount of SFAs, MUFAs, and PUFAs in DHM.

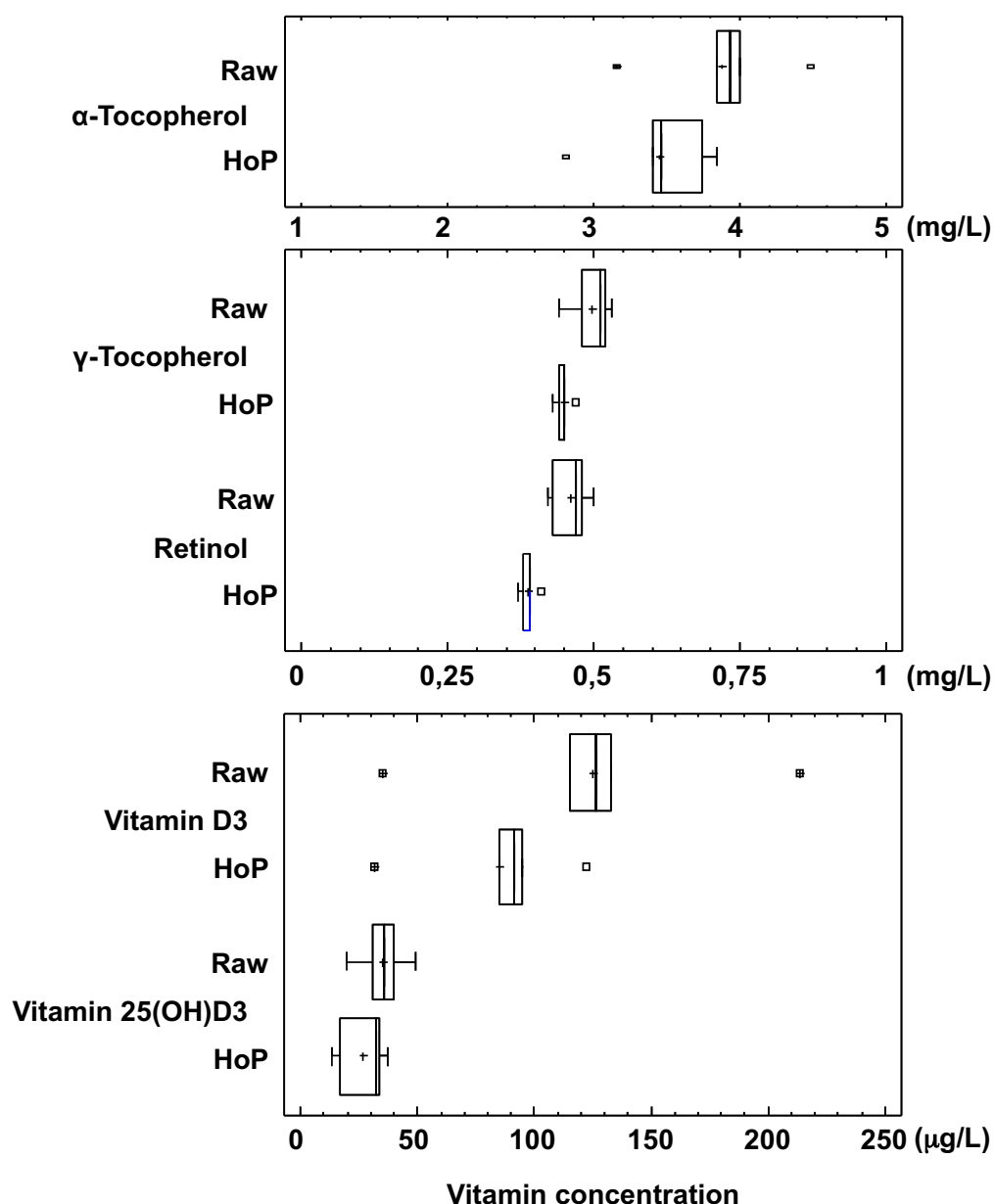


**Figure 4.** Boxplots showing the changes in bile salt stimulated lipase (BSSL) activity in DHM samples ( $n=8$ ) after Holder pasteurization (HoP, 62.5°C, 30 min) and HTST treatment at 70 and 72°C for 5, 15 and 25 s. The height of the box indicates the interquartile range (3<sup>rd</sup> quartile–1<sup>st</sup> quartile), the horizontal line in the box bar represents the median concentration value and the cross represents the mean concentration value. Separate dot represents an outlier (larger than 3<sup>rd</sup> quartile by at least 1.5 times the IQR). No differences in mean BSSL activity values were found (Kruskal Wallis test,  $p=0.087$ ).



**Figure 5.** Boxplots showing the concentrations of water-soluble vitamins (flavin-adenine dinucleotide, nicotinamide, pyridoxal, riboflavin and thiamine) in DHM samples ( $n=5$ ) before (Raw) and after Holder pasteurization (HoP, 62.5°C, 30 min). The length of the box indicates the interquartile range (3<sup>rd</sup> quartile–1<sup>st</sup> quartile), the vertical line in the box represents the median concentration value and the cross represents the mean concentration value. Separate dots represent outliers (larger than 3<sup>rd</sup> quartile or smaller than 1<sup>st</sup> quartile by at least 1.5 times the IQR) and squares represent extreme values. No differences in mean concentration values were found (one-way ANOVA,  $p>0.05$ ).





**Figure 6.** Boxplots showing the concentration of fat-soluble vitamins ( $\alpha$ -tocopherol,  $\gamma$ -tocopherol, retinol, vitamin D<sub>3</sub> and 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>) in DHM samples (n=5) before (Raw) and after Holder pasteurization (HoP, 62.5°C, 30 min). The length of the box indicates the interquartile range (3<sup>rd</sup> quartile–1<sup>st</sup> quartile), the vertical line in the box represents the median concentration value and the cross represents the mean concentration value. Separate dots represent outliers (larger than 3<sup>rd</sup> quartile or smaller than 1<sup>st</sup> quartile by at least 1.5 times the IQR) and squares represent extreme values. No differences in mean concentration values were found (one-way ANOVA,  $p > 0.05$ ).

## VIII.7. TABLES

**Table 1.** Glucose and *myo*-inositol concentration in DHM production batches before (Raw; n=10) and after Holder pasteurization (62.5°C, 30 min; n=10) or HTST treatment at 70°C (n=3), 72°C (n=4) and 75°C (n=3) for 5, 10, 15, 20, 25 seconds.

	Raw	T <sup>a</sup> (°C)	HTST treatment										Holder pasteurization	p- value*
			Time (s)											
			5	10	15	20	25							
	Mean (95% CI)	Mean (95% CI)	Mean (95% CI)	Mean (95% CI)	Mean (95% CI)	Mean (95% CI)	Mean (95% CI)	Mean (95% CI)	Mean (95% CI)	Mean (95% CI)	Mean (95% CI)	Mean (95% CI)		
Lactose (g/L)	65.53 (62.26–68.81)	70	75.85 (72.58–79.13)	73.27 (69.99–76.54)	71.80 (68.52–75.07)	74.12 (70.85–77.40)	72.08 (68.81–75.36)	70.27 (67.00–73.55)				0.088		
	65.77 (63.37–68.16)	72	73.86 (71.46–76.26)	72.02 (69.25–74.80)	70.86 (68.46–73.25)	68.87 (66.47–71.26)	71.78 (68.79–73.58)	70.06 (67.66–72.46)				0.062		
	66.02 (62.54–69.50)	75	70.20 (66.72–73.68)	71.08 (67.60–74.56)	67.97 (64.50–71.45)	69.50 (66.02–72.98)	70.86 (67.37–74.33)	72.82 (69.34–76.30)				0.496		
Glucose (mg/L)	304.95 <sup>ab</sup> (284.17–325.73)	70	278.81 <sup>ab</sup> (258.03–299.58)	261.06 <sup>ab</sup> (240.28–281.83)	257.64 <sup>ab</sup> (236.86–278.42)	261.29 <sup>ab</sup> (240.51–282.81)	253.03 <sup>a</sup> (232.26–273.81)	323.62 <sup>b</sup> (302.85–344.40)				0.017		
	246.17 (231.30–261.03)	72	231.72 (216.86–246.58)	232.45 (215.28–249.61)	244.06 (229.20–258.92)	257.41 (242.54–272.27)	244.07 (229.21–258.93)	277.19 (262.25–291.98)				0.072		
	287.27 (249.28–325.26)	75	267.29 (229.3–305.28)	275.55 (237.23–313.22)	261.05 (223.06–299.04)	266.74 (228.75–304.73)	263.31 (225.32–301.30)	295.79 (257.80–333.78)				0.940		
myo- Inositol (mg/L)	250.85 (231.92–269.79)	70	290.82 (271.89–309.75)	290.83 (271.91–309.77)	278.40 (259.46–297.32)	269.44 (250.52–288.38)	257.51 (238.58–276.44)	248.36 (229.43–267.30)				0.124		
	199.84 (176.58–223.09)	72	244.80 (221.53–268.05)	231.40 (204.55–258.26)	242.14 (218.88–265.40)	234.73 (211.47–257.98)	235.53 (212.28–258.80)	207.39 (184.14–230.65)				0.340		
	243.74 (183.69–303.79)	75	224.13 (164.08–284.18)	231.09 (171.04–291.14)	224.01 (163.96–284.06)	219.83 (159.79–279.88)	223.27 (163.22–283.32)	225.77 (165.72–285.82)				0.999		

Glucose and *myo*-inositol concentrations were expressed as means and 95% confidence intervals (95% CI).

<sup>a</sup>, temperature during HTST processing.

\*One-way ANOVA test; different superscripts represent differences between mean concentrations after Tukey multiple comparison *post hoc* tests.

**Table 2.** Lipid composition of the main lipid classes found in DHM production batches before (Raw; n=10) and after Holder pasteurization (62.5°C, 30 min; n=10) or HTST treatment at 70°C (n=3), 72°C (n=4) and 75°C (n=3) for 5, 10, 15, 20, 25 seconds.

Raw	T <sup>a</sup> (°C)	HTST treatment Time (s)					Holder pasteurization	p- value*
		Time (s)						
		5	10	15	20	25		
Median (IQR)		Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	
CE	70	0.05 (0.04–0.07)	0.06 (0.06–0.09)	0.07 (0.05–0.10)	0.07 (0.07–0.10)	0.09 (0.06–0.11)	0.03 (0.02–0.04)	0.152
	72	0.04 (0.04–0.05)	0.02 (0.02–0.03)	0.01 (0.01–0.02)	0.02 (0.01–0.02)	0.02 (0.01–0.02)	0.03 (0.02–0.04)	0.051
	75	0.03 (0.03–0.04)	0.01 (0.01–0.05)	0.02 (0.01–0.02)	0.01 (0.01–0.02)	0.01 (0.01–0.02)	0.02 (0.01–0.02)	0.453
CHOL + FFA <sup>‡</sup>	70	0.36 (0.28–0.43)	0.34 (0.26–0.42)	0.23 (0.15–0.32)	0.30 (0.21–0.38)	0.30 (0.22–0.38)	0.19 (0.09–0.28)	0.340
	72	0.33 (0.27–0.39)	0.23 (0.18–0.29)	0.34 (0.27–0.40)	0.22 (0.17–0.28)	0.25 (0.20–0.31)	0.19 (0.13–0.25)	0.133
	75	0.31 (0.20–0.41)	0.23 (0.14–0.33)	0.22 (0.13–0.31)	0.21 (0.12–0.31)	0.24 (0.15–0.34)	0.09 (0.01–0.19)	0.801
TAG <sup>‡</sup>	70	96.72 <sup>a</sup> (96.28–97.14)	94.61 <sup>a</sup> (94.28–94.95)	94.84 <sup>a</sup> (94.50–95.18)	94.95 <sup>a</sup> (94.61–95.29)	95.51 <sup>ab</sup> (95.18–95.85)	96.66 <sup>a</sup> (96.13–97.18)	0.000
	72	96.85 (96.11–97.60)	95.89 (95.14–96.63)	95.73 (94.87–96.59)	96.46 (95.71–97.20)	96.54 (95.79–97.29)	97.33 (96.58–98.08)	0.285
	75	96.75 (95.95–97.55)	96.11 (95.36–96.86)	96.15 (95.41–96.91)	96.50 (95.75–97.25)	96.47 (95.73–97.23)	98.21 (96.82–99.60)	0.492
DAG <sup>‡</sup>	70	2.70 <sup>a</sup> (2.27–3.13)	4.77 <sup>b</sup> (4.43–5.11)	4.71 <sup>b</sup> (4.37–5.04)	4.49 <sup>ab</sup> (4.15–4.82)	3.91 <sup>abc</sup> (3.57–4.24)	3.04 <sup>ab</sup> (2.51–3.56)	0.000
	72	2.63 (1.93–3.34)	3.65 (2.95–4.35)	3.74 (2.92–4.55)	3.12 (2.41–3.81)	3.00 (2.30–3.70)	2.35 (1.65–3.05)	0.290
	75	2.76 (2.06–3.47)	3.49 (2.82–4.15)	3.41 (2.74–4.07)	3.13 (2.46–3.79)	3.09 (2.43–3.76)	1.63 (0.41–2.85)	0.447

**Table 2 (cont.).** Lipid composition of the main lipid classes found in DHM production batches before (Raw; n=10) and after Holder pasteurization (62.5°C, 30 min; n=10) or HTST treatment at 70°C (n=3), 72°C (n=4) and 75°C (n=3) for 5, 10, 15, 20, 25 seconds.

	Raw	T <sup>a</sup> (°C)	HTST treatment					Holder pasteurization	p- value*
			Time (s)						
			5	10	15	20	25		
MAG	Median (IQR)		Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	
	0.10 (0.05–0.15)	70	0.09 (0.06–0.10)	0.10 (0.06–0.10)	0.07 (0.05–0.09)	0.10 (0.03–0.11)	0.06 (0.05–0.10)	0.03 (0.03–0.04)	0.383
	0.08 (0.05–0.10)	72	0.04 (0.03–0.05)	0.04 (0.03–0.04)	0.04 (0.02–0.05)	0.04 (0.03–0.05)	0.04 (0.03–0.06)	0.02 (0.01–0.04)	0.454
	0.08 (0.07–0.11)	75	0.03 (0.02–0.05)	0.04 (0.02–0.05)	0.05 (0.04–0.05)	0.04 (0.02–0.05)	0.04 (0.03–0.04)	0.01	0.070
ΣPL <sup>‡</sup>	0.06 (0.03–0.09)	70	0.10 (0.07–0.13)	0.11 (0.08–0.14)	0.08 (0.05–0.11)	0.10 (0.07–0.13)	0.12 (0.09–0.15)	0.04 (0.00–0.07)	0.102
	0.06 <sup>a</sup> (0.02–0.09)	72	0.15 <sup>a</sup> (0.11–0.18)	0.16 <sup>a</sup> (0.12–0.19)	0.14 <sup>a</sup> (0.10–0.17)	0.14 <sup>a</sup> (0.11–0.17)	0.13 <sup>a</sup> (0.10–0.17)	0.06 <sup>a</sup> (0.03–0.09)	0.018
	0.05 <sup>a</sup> (0.02–0.07)	75	0.11 <sup>ab</sup> (0.09–0.13)	0.09 <sup>ab</sup> (0.07–0.12)	0.14 <sup>a</sup> (0.12–0.16)	0.09 <sup>ab</sup> (0.07–0.11)	0.11 <sup>ab</sup> (0.09–0.13)	0.05 <sup>ab</sup> (0.01–0.08)	0.015
	28.68 (28.03–29.24)	70	29.00 (20.38–30.45)	24.91 (23.41–32.43)	22.81 (18.63–29.80)	32.07 (24.56–32.73)	22.29 (19.20–25.79)	28.70 (26.06–31.35)	0.400
PE	28.88 (27.06–31.38)	72	27.95 (24.10–28.53)	26.10 (23.03–26.90)	28.95 (27.36–40.77)	26.85 (22.92–28.62)	28.09 (22.63–30.14)	23.45 (22.77–27.32)	0.442
	28.39 (26.58–29.73)	75	22.68 (22.17–26.53)	27.39 (26.62–27.95)	25.31 (22.33–26.35)	25.88 (25.68–33.53)	27.03 (25.21–28.97)	24.22	0.138
PI	3.21 (2.34–4.15)	70	3.08 (2.01–3.53)	2.90 (2.33–3.44)	2.65 (0–3.25)	5.15 (4.57–8.16)	3.42 (2.06–3.73)	3.30 (3.19–3.42)	0.186
	3.63 (3.37–4.39)	72	3.00 (2.84–3.25)	3.21 (2.84–3.58)	3.80 (2.63–4.96)	3.07 (2.89–3.22)	3.50 (3.01–4.00)	4.03 (3.39–4.63)	0.212
	2.70 (2.56–5.89)	75	3.20 (2.86–3.38)	3.57 (2.80–3.88)	2.85 (2.20–4.85)	3.20 (3.00–4.17)	3.46 (2.80–3.75)	4.47	0.873

**Table 2 (cont.).** Lipid composition of the main lipid classes found in DHM production batches before (Raw; n=10) and after Holder pasteurization (62.5°C, 30 min; n=10) or HTST treatment at 70°C (n=3), 72°C (n=4) and 75°C (n=3) for 5, 10, 15, 20, 25 seconds.

Raw	T <sup>a</sup> (°C)	HTST treatment					Holder		p- value*
		Time (s)					pasteurization		
		5	10	15	20	25	Median (IQR)	Median (IQR)	
PS	70	5.69 (5.11 – 6.51)	5.36 (4.54 – 5.71)	5.23 (5.14 – 14.34)	8.10 (5.85 – 16.44)	4.80 (2.48 – 6.41)	4.81 (4.54 – 5.08)	4.81 (4.54 – 5.08)	0.260
	72	6.35 (4.06 – 7.34)	5.62 (5.37 – 5.84)	5.82 (2.88 – 6.82)	5.01 (4.35 – 5.50)	5.91 (4.54 – 6.67)	5.07 (4.89 – 5.96)	5.07 (4.89 – 5.96)	0.852
	75	4.71 (0 – 5.63)	5.28 (4.86 – 9.98)	4.10 (4.02 – 5.57)	7.02 (5.75 – 7.48)	6.85 (4.47 – 7.06)	7.11 (4.47 – 7.06)	7.11 (4.47 – 7.06)	0.329
PC	70	26.94 (24.45 – 29.23)	32.28 (30.66 – 34.85)	39.27 (27.52 – 43.70)	37.37 (24.33 – 41.63)	30.82 (28.78 – 34.84)	29.82 (28.72 – 30.92)	29.82 (28.72 – 30.92)	0.558
	72	27.98 (26.85 – 30.05)	26.65 (24.60 – 28.55)	25.11 (14.01 – 29.99)	26.70 (25.73 – 29.19)	29.41 (27.60 – 29.98)	26.87 (25.89 – 28.71)	26.87 (25.89 – 28.71)	0.714
	75	27.95 (23.35 – 28.63)	23.70 (23.07 – 29.85)	25.87 (25.33 – 29.15)	30.61 (25.58 – 34.08)	27.28 (27.06 – 29.81)	25.77 (27.06 – 29.81)	25.77 (27.06 – 29.81)	0.688
SM <sup>‡</sup>	70	35.47 (28.42 – 42.52)	32.72 (24.92 – 40.52)	29.22 (21.42 – 37.02)	19.68 (11.88 – 27.48)	38.36 (30.66 – 46.26)	33.35 (24.72 – 41.99)	33.35 (24.72 – 41.99)	0.164
	72	32.73 (28.68 – 36.78)	38.44 (34.39 – 42.50)	35.95 (31.27–40.63)	38.78 (34.73 – 42.83)	35.70 (31.65 – 39.75)	38.21 (34.16 – 42.27)	38.21 (34.16 – 42.27)	0.642
	75	37.95 (34.35 – 41.56)	40.80 (37.33 – 44.28)	40.67 (37.20 – 44.15)	31.33 (27.86 – 34.81)	35.41 (31.94 – 38.89)	38.43 (32.19 – 44.67)	38.43 (32.19 – 44.67)	0.119

n: number of production batches analyzed; CE: cholesteryl esters; CHOL: cholesterol; FFA: free fatty acids; MAG: monoacylglycerides; PL: polar lipids; PE: phosphatidylethanolamine; PI: phosphatidylinositol; PS: phosphatidylserine; PC: phosphatidylcholine; SM: sphingomyelin; T: temperature; TAG: triacylglycerides. Levels of lipid classes CE, CHO+FFA, TAG, DAG, MAG, and PL were expressed as percentages of total lipid DHM fraction. Levels of PE, PI, PS, PC, and SM were expressed as percentages of total PL fraction; median and interquartile range (IQR) values are used when data were not normally distributed and mean and 95% confidence interval (95% CI) when they were.

<sup>a</sup>, temperature during HTST processing.

\*, Kruskal-Wallis tests were used to determine the differences between FA levels in raw and heat treated DHM when data were not normally distributed and one-way ANOVA tests when they were. Different superscript letters means difference in *post-hoc* pairwise comparison using Nemenyi test with Chi-squared approximation when data were not normally distributed and Tukey test when they were.

‡, Normally distributed.

**Table 3.** Fatty acid profile of raw DHM fat (n=10).

<b>Fatty acid</b>	<b>Median or Mean (g/100g)</b>	<b>IQR or 95% IC (g/100 g)</b>
C8:0; caprylic acid	0.14	0.12 – 0.16
C10:0; capric acid	1.41	1.29 – 1.54
C12:0; lauric acid <sup>‡</sup>	6.28	5.51 – 7.05
C14:0; myristic acid	6.64	6.09 – 7.14
C15:0; pentadecylic acid <sup>‡</sup>	0.16	0.14 – 0.19
C16:0; palmitic acid <sup>‡</sup>	22.64	21.39 – 23.90
C17:0; margaric acid	0.15	0.13 – 0.16
C18:0; stearic acid	5.42	5.19 – 5.89
C20:0; arachidic acid	0.14	0.09 – 0.18
C16:1 <i>cis</i> -9; palmitoleic acid	1.64	1.45 – 1.76
C18:1 <i>cis</i> -9; oleic acid	35.72	34.57 – 36.96
C18:1 <i>cis</i> -11; <i>cis</i> -vaccenic acid	1.40	1.26 – 1.51
C18:1 <i>trans</i> -11; vaccenic acid	0.11	0.07 – 0.14
C18:2 <i>cis</i> , <i>cis</i> -9,12; linoleic acid <sup>‡</sup>	16.47	15.87 – 17.07
C18:2 <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11; conjugated linoleic acid (CLA) <sup>‡</sup>	0.11	0.08 – 0.15
C18:3 all- <i>cis</i> -9,12,15; $\alpha$ -linolenic acid	0.22	0.18 – 0.26
C20:3 all- <i>cis</i> -6,9,12; $\gamma$ -linolenic acid <sup>‡</sup>	0.17	0.11 – 0.24
C20:4 all- <i>cis</i> -5,8,11,14; arachidonic acid (ARA)	0.18	0.14 – 0.25
C22:6 all- <i>cis</i> -4,7,10,13,16,19; acid docosahexaenoic (DHA) <sup>‡</sup>	0.07	0.05 – 0.10
<b>SFAs<sup>‡</sup></b>	43.05	40.71 – 45.40
<b>MUFAs</b>	37.58	35.42 – 39.74
<b>PUFAs</b>	17.29	16.64 – 17.94
<b>Total n-6 PUFAs<sup>‡</sup></b>	16.85	16.22 – 17.47
<b>Total n-3 PUFAs<sup>‡</sup></b>	0.32	0.21 – 0.42
<b>n-6/n-3<sup>‡</sup></b>	63	43 – 83
<b>DHA/ARA</b>	0.38	0.31 – 0.43

n: number of production batches analyzed; MUFAs: monounsaturated fatty acids; PUFAs: polyunsaturated fatty acids; SFAs: saturated fatty acids; n-3:  $\omega$ -3 FAs, n-6:  $\omega$ -6 FAs.

Levels of fatty acids were expressed as percentages of total fatty acid methyl esters (FAMES); median and interquartile range (IQR) values are used when data were not normally distributed and mean and 95% confidence interval (95% CI) when they were.

‡, Normally distributed.

**Table 4.** Main classes of fatty acids in DHM processing batches before (Raw; n=10) and after Holder pasteurization (62.5°C, 30 min; n=10) or HTST treatment at 70°C (n=3), 72°C (n=4) and 75°C (n=3) for 5, 10, 15, 20, 25 seconds.

	Raw	HTST treatment					Holder pasteurization	p-value*
		T <sup>a</sup> (°C)	Time (s)					
			5	10	15	20		
	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	
SFAs <sup>‡</sup>	40.30 (38.23 – 42.37)	70	39.97 (37.90 – 42.04)	40.04 (39.97 – 42.12)	40.57 (38.50 – 42.64)	41.72 (39.64 – 43.79)	39.78 (37.71 – 41.85)	42.88 (40.80 – 44.95)
	43.67 (42.17 – 45.16)	72	40.83 (39.33 – 42.33)	41.50 (40.01 – 43.00)	41.77 (40.05 – 43.50)	40.92 (39.43 – 42.42)	41.06 (39.57 – 42.56)	43.05 (41.55 – 44.54)
	45.00 (43.25 – 46.73)	75	43.64 (41.90 – 45.38)	43.87 (42.12 – 45.61)	41.28 (39.53 – 43.02)	40.97 (39.22 – 42.71)	40.81 (39.06 – 42.55)	44.60 (42.84 – 46.33)
MUFAs	38.70 (36.08 – 44.11)	70	38.53 (36.62 – 44.31)	39.13 (38.38 – 45.95)	38.86 (35.79 – 44.95)	42.10 (36.22 – 43.23)	38.46 (38.32 – 43.93)	37.18 (35.64 – 43.38)
	36.97 (36.05 – 38.69)	72	37.28 (36.74 – 39.20)	36.81 (35.93 – 38.97)	37.57 (36.28 – 40.24)	37.02 (36.41 – 39.33)	37.26 (37.13 – 38.98)	37.10 (36.26 – 38.91)
	36.25 (33.08 – 38.15)	75	36.32 (35.06 – 36.88)	36.14 (33.78 – 38.31)	36.14 (35.81 – 38.60)	36.20 (36.10 – 37.95)	36.64 (35.34 – 38.44)	35.83 (34.46 – 37.45)
PUFAs	18.08 (16.87 – 18.63)	70	18.80 (15.84 – 19.32)	19.03 (15.64 – 19.18)	18.46 (15.74 – 18.62)	15.26 (14.35 – 19.09)	18.81 (16.25 – 18.85)	15.83 (14.94 – 18.34)
	17.00 <sup>a</sup> (16.44 – 17.53)	72	18.73 <sup>c</sup> (18.31 – 19.33)	18.60 <sup>bc</sup> (18.10 – 19.01)	17.97 <sup>abc</sup> (16.88 – 18.84)	18.93 <sup>c</sup> (18.43 – 19.25)	18.58 <sup>bc</sup> (18.36 – 18.86)	17.16 <sup>ab</sup> (17.04 – 17.55)
	16.65 (16.16 – 18.54)	75	17.87 (16.70 – 19.33)	17.21 (16.76 – 19.74)	19.54 (18.07 – 20.03)	19.46 (18.14 – 21.00)	19.41 (18.28 – 21.15)	16.82 (15.78 – 19.82)



**Table 4 (cont.).** Main classes of fatty acids in DHM processing batches before (Raw; n=10) and after Holder pasteurization (62.5°C, 30 min; n=10) or HTST treatment at 70°C (n=3), 72°C (n=4) and 75°C (n=3) for 5, 10, 15, 20, 25 seconds.

	Raw	HTST treatment					Holder pasteurization		
		T <sup>a</sup> (°C)	Time (s)					Median (IQR)	p-value*
			5	10	15	20	25		
<b>n-3</b> <b>PUFAs<sup>†</sup></b>	Median (IQR)		Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	
	0.39 (0.30 – 0.49)	<b>70</b>	0.44 (0.34 – 0.46)	0.32 (0.17 – 0.54)	0.30 (0.23 – 0.42)	0.20 (0.20 – 0.40)	0.34 (0.10 – 0.30)	0.23 (0.13 – 0.33)	0.178
	0.34 <sup>a</sup> (0.24 – 0.43)	<b>72</b>	0.57 <sup>a</sup> (0.47 – 0.67)	0.58 <sup>a</sup> (0.48 – 0.68)	0.53 <sup>a</sup> (0.42 – 0.65)	0.56 <sup>a</sup> (0.46 – 0.66)	0.58 <sup>a</sup> (0.48 – 0.68)	0.33 <sup>a</sup> (0.23 – 0.43)	0.038
<b>n-6</b> <b>PUFAs<sup>†</sup></b>	0.22 <sup>ab</sup> (0.14 – 0.30)	<b>75</b>	0.32 <sup>abc</sup> (0.23 – 0.40)	0.38 <sup>abc</sup> (0.30 – 0.47)	0.47 <sup>bc</sup> (0.39 – 0.55)	0.54 <sup>c</sup> (0.46 – 0.63)	0.53 <sup>c</sup> (0.45 – 0.62)	0.20 <sup>a</sup> (0.12 – 0.28)	0.001
	17.30 (15.70 – 18.90)	<b>70</b>	17.36 (15.76 – 18.96)	17.14 (15.54 – 18.74)	17.18 (15.58 – 18.77)	15.93 (14.33 – 17.53)	17.49 (15.89 – 19.09)	16.05 (14.45 – 17.65)	0.881
	16.53 <sup>a</sup> (16.20 – 16.86)	<b>72</b>	17.99 <sup>b</sup> (17.67 – 18.32)	17.73 <sup>bc</sup> (17.40 – 18.05)	17.20 <sup>abc</sup> (16.83 – 17.58)	18.05 <sup>b</sup> (17.72 – 18.37)	17.77 <sup>bc</sup> (17.45 – 18.10)	16.84 <sup>ac</sup> (16.51 – 17.16)	0.000
<b>n-3</b> <b>PUFAs<sup>†</sup></b>	16.82 (15.56 – 18.10)	<b>75</b>	17.50 (16.23 – 18.76)	17.34 (16.08 – 18.61)	18.54 (17.28 – 19.81)	18.73 (17.46 – 19.99)	18.90 (17.63 – 20.16)	17.20 (15.93 – 18.46)	0.457

ni: number of production batches analyzed; MUFAs: monounsaturated fatty acids; PUFAs: polyunsaturated fatty acids; SFAs: saturated fatty acids; n-3: ω-3 FAs; n-6: ω-6 FAs; T: temperature.

Levels of fatty acids were expressed as percentages of total fatty acid methyl esters (FAMES); median and interquartile range (IQR) values are used when data were not normally distributed and mean and 95% confidence interval (95% CI) when they were.

<sup>a</sup>, temperature during HTST processing.

\*, Kruskal-Wallis tests were used to determine the differences between FA levels in raw and heat treated milk when data were not normally distributed and one-way ANOVA tests when they were. Different superscript letters means differences in *post-hoc* pairwise comparison using Nemenyi test with Chi-squared approximation when data were not normally distributed and Tukey test when they were.

†: Normally distributed.



**Table 5.** Concentration of water-soluble vitamins in DHM (n=5) before (raw) and after Holder pasteurization (62.5°C, 30 min).

	Raw	Holder pasteurization	<i>p</i> -value*
	Mean (95% CI)	Mean (95% CI)	
<b>Thiamin (Vitamin B<sub>1</sub>)</b> (µg/L)	22.18 (18.03 – 26.33)	22.20 (18.05 – 26.35)	0.995
<b>Riboflavin</b> (µg/L)	33.20 (20.71 – 45.69)	37.48 (25.02 – 49.90)	0.769
<b>FAD</b> (µg/L)	369.10 (298.68 – 439.52)	427.12 (356.70 – 497.54)	0.388
<b>Total Vitamin B<sub>2</sub></b> (µg/L)	402.30 (335.25 – 469.35)	464.60 (397.55 – 531.65)	0.786
<b>Nicotinamide (Vitamin B<sub>3</sub>)</b> (µg/L)	501.80 (429.49 – 574.11)	526.36 (454.05 – 598.67)	0.690
<b>Pyridoxal (Vitamin B<sub>6</sub>)</b> (µg/L)	91.02 (81.78 – 100.26)	80.84 (71.60 – 90.07)	0.295

\*One-way ANOVA tests were used to determine the differences between mean concentrations.  
FAD: Flavin adenine dinucleotide

**Table 6.** Concentration of water-soluble vitamins in DHM before (raw) and after Holder pasteurization (62.5°C, 30 min) or HTST treatment at 70°C, 72°C and 75°C for 15 and 25 seconds.

	n	Raw Mean (95% CI)	T <sup>a</sup> (°C)	HTST treatment			Holder pasteurization		p-value*
				Time (s)					
				15	Mean (95% CI)	25	Mean (95% CI)	Mean (95% CI)	
Thiamin (Vitamin B <sub>1</sub> ) (µg/L)	1	19	70	18.3		14.1	17.6		
	2	22.8 (11.38 – 34.22)	72	22.6 (11.18 – 34.02)		23.15 (11.73 – 34.51)	22.75 (11.33 – 34.17)		0.999
	2	23.15 (13.17 – 33.13)	75	21.3 (11.32 – 31.28)		25.3 (15.32 – 35.28)	23.6 (13.62 – 33.58)		0.953
Riboflavin (Vitamin B <sub>2</sub> + FAD) (µg/L)	1	453.63	70	416.9		469.8	474.2		
	2	374.3 (168.65 – 579.95)	72	484.8 (279.15 – 690.45)		488.8 (283.15 – 694.45)	463.15 (257.50 – 668.80)		0.850
	2	390.6 (223.42 – 557.78)	75	435.9 (268.72 – 603.08)		455.15 (287.96 – 622.33)	461.25 (294.06 – 628.43)		0.930
Nicotinamide (Vitamin B <sub>3</sub> ) (µg/L)	1	482.4	70	435.2		390.4	653.6		
	2	581.4 (491.09 – 671.71)	72	488.8 (398.50 – 579.11)		543 (452.69 – 633.31)	531.8 (441.49 – 622.11)		0.605
	2	431.9 (275.14 – 588.66)	75	359.4 (202.64 – 516.16)		403.6 (246.83 – 560.36)	566.5 (409.73 – 723.26)		0.403
Pyridoxal (Vitamin B <sub>6</sub> ) (µg/L)	1	107	70	91.9		95.9	97.9		
	2	84.55 (71.72 – 97.37)	72	77 (64.17 – 89.82)		75.7 (62.87 – 88.52)	80.45 (67.62 – 93.27)		0.781
	2	89.5 (61.69 – 117.31)	75	81.3 (53.49 – 109.11)		83.55 (55.74 – 111.36)	75.7 (47.89 – 103.51)		0.916

Vitamin concentrations were expressed as mean and 95% confidence interval (95% CI).

n, number of production batches processed at the indicated temperature. T, temperature during HTST processing. FAD, Flavin adenine dinucleotide.

<sup>a</sup>, temperature during HTST processing.

\*One-way ANOVA test was used to determine the differences between mean vitamin concentrations in raw and heat processed DHM.

**Table 7.** Concentration of in fat-soluble vitamins in DHM (n=5) before (raw) and after Holder pasteurization (62.5°C, 30 min).

	Raw	Holder pasteurization	<i>p</i> -value*
	Mean (95% CI)	Mean (95% CI)	
<b>Vitamin A (total retinol)</b> (mg/L)	0.44 (0.41 – 0.47)	0.41 (0.38 – 0.44)	0.318
<b>Vitamin E (<math>\alpha</math>-tocopherol)</b> (mg/L)	3.81 (3.50 – 4.12)	3.52 (3.17 – 3.87)	0.359
<b>Vitamin E (<math>\gamma</math>-tocopherol)</b> (mg/L)	0.48 (0.45 – 0.50)	0.46 (0.44 – 0.49)	0.635
<b>Vitamin D<sub>3</sub></b> ( $\mu$ g/L)	84.95 (48.07 – 121.83)	124.68 (87.80 – 161.56)	0.249
<b>Vitamin 25 (OH)D<sub>3</sub></b> ( $\mu$ g/L)	26.65 (18.63 – 34.66)	34.86 (26.85 – 42.88)	0.271

\*One-way ANOVA tests were used to determine the differences between mean concentrations before and after Holder pasteurization.

**Table 8.** Concentrations of fat-soluble vitamins in DHM before (raw) and after HTST treatment at 70°C, 72°C and 75°C for 15 and 25 seconds and Holder pasteurization (62.5°C, 30 minutes).

	n	Raw	HTST treatment				Holder pasteurization	p-value*
			T <sup>a</sup> (°C)	Time (s)				
				Mean (95% CI)	15	25		
Vitamin A (total retinol) (mg/L)	1	416	70	372 (343.22 – 476.78)	402 (333.72 – 467.28)	379	0.651	
	2	456.5 (389.72 – 523.28)	72	410 (343.22 – 476.78)	400.5 (333.72 – 467.28)	403.5 (336.72 – 470.28)		
	2	431.5 (373.17 – 489.83)	75	432 (373.67 – 490.33)	432.5 (374.17 – 490.83)	431 (372.67 – 489.33)		1.000
Vitamin E (α-tocopherol) (mg/L)	1	3160	70	2810	2980	2680	0.495	
	2	4160 (3672.41 – 4647.59)	72	3695 (3207.41 – 4182.59)	3640 (3152.41 – 4127.59)	3700 (3212.41 – 4187.59)		
	2	3790 (3225.2 – 4354.8)	75	3665 (3100.2 – 4229.8)	3770 (3205.2 – 4334.8)	3695 (3130.2 – 4259.8)		0.986
Vitamin E (γ-tocopherol) (mg/L)	1	441	70	429	422	403	0.508	
	2	489.5 (453.75 – 525.25)	72	456 (420.25 – 491.75)	451 (415.25 – 486.75)	458.5 (422.75 – 494.25)		
	2	481.5 (429.77 – 533.22)	75	479.5 (427.77 – 531.22)	491 (439.27 – 542.72)	489 (437.27 – 540.72)		0.985
Vitamin D3 (μg/L)	1	31.50	70	35.33	52.16	30.85	0.102	
	2	93.9 (79.16 – 107.02)	72	100.06 (86.13 – 113.99)	93.65 (79.71 – 107.58)	123.76 (109.83 – 137.69)		
	2	103.54 (51.66 – 155.41)	75	147.22 (95.34 – 199.09)	126.92 (75.05 – 178.80)	170.28 (118.41 – 222.16)		0.427

**Table 8 (cont.).** Concentrations of fat-soluble vitamins in DHM before (raw) and after HTST treatment at 70°C, 72°C and 75°C for 15 and 25 seconds and Holder pasteurization (62.5°C, 30 minutes).

	n	Raw	HTST treatment				Holder pasteurization	p-value*
			T <sup>a</sup> (°C)	Time (s)		Mean (95% CI)		
				15	25			
Vitamin 25 (OH)D <sub>3</sub> (µg/L)	1	12.96 25.18	70	19.45 25.21	19.46 33.49	13.36 33.15		
	2	(14.74 – 35.61)	72	(14.77 – 35.64)	(23.05 – 43.93)	(22.71 – 43.58)		0.563
	2	34.95 (16.56 – 53.33)	75	42.44 (24.05 – 60.83)	30.512 (12.13 – 48.91)	44.28 (25.89 – 62.67)		0.717

Vitamin concentrations were expressed as mean and 95% confidence interval (95% CI).

n, number of production batches processed at the indicated temperature. T, temperature during HTST processing.

<sup>a</sup>, temperature during HTST processing.

\*One-way ANOVA tests were used to determine the differences between mean vitamin concentrations in raw and heat processed DHM.

**Table S1.** Content of saturated fatty acids (SFA) in DHM before (raw) and after Holder pasteurization (62.5°C, 30 minutes) or HTST treatment at 70°C (n=3), 72°C (n=4) and 75°C (n=3) for 5, 10, 15, 20, 25 seconds.

SFA	Raw	T <sup>a</sup> (°C)	HTST treatment					Holder	
			Time (s)					pasteurization	p-value*
			5	10	15	20	25		
	Median (IQR)		Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	
<b>C8:0</b>	0.14 (0.12–0.19)	<b>70</b>	0.17 (0.17–0.19)	0.09 (0.08–0.16)	0.14 (0.11–0.16)	0.16 (0.14–0.17)	0.09 (0.09–0.16)	0.22 (0.11–0.27)	0.147
	0.15 (0.13–0.16)	<b>72</b>	0.13 (0.12–0.13)	0.13 (0.11–0.14)	0.13 (0.11–0.14)	0.15 (0.13–0.16)	0.14 (0.12–0.15)	0.17 (0.11–0.26)	0.604
	0.13 (0.11–0.18)	<b>75</b>	0.17 (0.15–0.20)	0.16 (0.13–0.23)	0.17 (0.12–0.20)	0.14 (0.14–0.18)	0.18 (0.12–0.19)	0.15 (0.15–0.23)	0.843
<b>C10:0</b>	1.36 (1.22–1.51)	<b>70</b>	1.32 (1.18–1.35)	1.16 (1.08–1.36)	1.23 (1.10–1.25)	1.25 (1.05–1.31)	1.20 (1.11–1.41)	1.62 (1.42–1.96)	0.137
	1.42 (1.34–1.53)	<b>72</b>	1.29 (1.20–1.34)	1.27 (1.23–1.32)	1.40 (1.20–1.42)	1.29 (1.22–1.36)	1.30 (1.24–1.34)	1.46 (1.15–1.72)	0.557
	1.55 (1.28–1.94)	<b>75</b>	1.53 (1.53–1.85)	1.56 (1.44–1.75)	1.34 (1.2–1.51)	1.34 (1.32–1.42)	1.40 (1.32–1.53)	1.69 (1.54–1.94)	0.115
<b>C12:0<sup>†</sup></b>	5.14 (4.65–5.63)	<b>70</b>	4.90 (4.41–5.39)	4.95 (4.46–5.44)	5.00 (4.51–5.50)	5.10 (4.60–5.60)	4.84 (4.35–5.40)	5.81 (5.32–6.30)	0.454
	6.48 (6.20–6.77) <sup>a</sup>	<b>72</b>	5.64 <sup>a</sup> (5.36–5.93)	5.73 <sup>a</sup> (5.44–6.01)	6.00 <sup>a</sup> (5.68–6.33)	5.63 <sup>a</sup> (5.34–5.91)	5.73 <sup>a</sup> (5.45–6.01)	6.33 <sup>a</sup> (6.04–6.61)	0.021
	7.15 (6.70–7.60) <sup>a</sup>	<b>75</b>	6.81 <sup>ab</sup> (6.36–7.26)	6.48 <sup>ab</sup> (6.07–6.90)	5.77 <sup>b</sup> (5.32–6.22)	5.60 <sup>b</sup> (5.20–6.00)	5.72 <sup>b</sup> (5.27–6.17)	7.28 <sup>a</sup> (6.83–7.73)	0.001
<b>C14:0</b>	4.94 (3.60–6.41)	<b>70</b>	5.02 (3.63–5.82)	4.85 (3.64–6.12)	5.03 (3.75–6.25)	4.85 (4.14–6.05)	5.01 (3.84–5.50)	5.94 (4.23–6.40)	0.970
	6.72 (6.19–7.19)	<b>72</b>	6.12 (5.85–6.43)	6.43 (6.10–6.59)	6.02 (6.01–6.50)	6.13 (5.72–6.43)	6.10 (5.78–6.59)	6.39 (6.07–6.97)	0.648
	7.09 (6.89–7.31)	<b>75</b>	6.56 (9.23–7.61)	6.87 (6.52–7.05)	6.26 (5.59–6.56)	6.06 (5.43–6.66)	6.00 (5.66–6.64)	6.68 (5.0–7.57)	0.230

**Table S1 (cont.).** Content of saturated fatty acids (SFA) in DHM before (raw) and after Holder pasteurization (62.5°C, 30 minutes) or HTST treatment at 70°C (n=3), 72°C (n=4) and 75°C (n=3) for 5, 10, 15, 20, 25 seconds.

SFA	Raw	T <sup>a</sup> (°C)	HTST treatment					Holder pasteurization	p- value*
			Time (s)						
			5	10	15	20	25		
C15:0 <sup>‡</sup>	Median (IQR)		Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	
	0.16 (0.11–0.20)	70	0.16 (0.11–0.20)	0.14 (0.09–0.18)	0.14 (0.10–0.18)	0.14 (0.09–0.18)	0.14 (0.09–0.18)	0.17 (0.13–0.22)	0.964
	0.16 (0.14–0.18)	72	0.20 (0.18–0.22)	0.20 (0.18–0.22)	0.17 (0.14–0.19)	0.18 (0.16–0.20)	0.19 (0.17–0.21)	0.16 (0.14–0.18)	0.293
	0.18 (0.13–0.23)	75	0.21 (0.15–0.26)	0.23 (0.18–0.28)	0.20 (0.15–0.26)	0.22 (0.16–0.27)	0.14 (0.08–0.18)	0.16 (0.11–0.21)	0.438
C16:0 <sup>‡</sup>	21.76 (20.30–23.21)	70	21.64 (20.19–23.09)	21.97 (20.51–23.42)	22.50 (21.04–23.95)	23.66 (22.21–25.11)	21.82 (20.36–23.27)	23.32 (21.87–24.77)	0.640
	22.87 (21.89–23.86)	72	20.97 (19.99–21.96)	21.10 (20.12–22.09)	21.84 (20.70–22.07)	20.92 (13.93–21.90)	20.78 (19.80–21.77)	22.34 (21.36–23.33)	0.236
	23.23 <sup>a</sup> (22.33–24.13)	75	21.92 <sup>ab</sup> (21.02–22.82)	22.12 <sup>ab</sup> (21.29–22.95)	21.18 <sup>ab</sup> (20.29–22.08)	20.78 <sup>ab</sup> (19.95–21.61)	20.52 <sup>b</sup> (19.62–21.42)	23.05 <sup>ab</sup> (22.16–23.95)	0.018
	0.17 (0.16–0.17)	70	0.17 (0.15–0.20)	0.16 (0.11–0.16)	0.14 (0.10–0.17)	0.14 (0–0.18)	0.14 (0.13–0.17)	0.14 (0.11–0.16)	0.368
C17:0	0.15 <sup>a</sup> (0.11–0.15)	72	0.21 <sup>b</sup> (0.19–0.22)	0.21 <sup>b</sup> (0.20–0.23)	0.18 <sup>ab</sup> (0.14–0.19)	0.19 <sup>ab</sup> (0.18–0.21)	0.20 <sup>ab</sup> (0.19–0.22)	0.14 <sup>ab</sup> (0.12–0.17)	0.014
	0.13 <sup>a</sup> (0.12–0.16)	75	0.20 <sup>b</sup> (0.17–0.20)	0.21 <sup>b</sup> (0.19–0.22)	0.18 <sup>b</sup> (0.17–0.22)	0.23 <sup>b</sup> (0.22–0.25)	0.22 <sup>b</sup> (0.21–0.23)	0.13 <sup>a</sup> (0.12–0.13)	0.008
	5.89 (5.44–7.26)	70	5.82 (5.74–7.74)	6.06 (5.73–7.24)	6.09 (5.76–6.73)	5.89 (4.72–7.57)	5.96 (5.91–7.26)	5.61 (5.53–6.29)	0.926
	5.35 (5.26–5.83)	72	6.13 (5.97–6.58)	6.05 (5.66–6.46)	5.71 (5.33–6.12)	5.99 (5.75–6.36)	5.92 (5.70–6.49)	5.38 (5.28–6.07)	0.368
C18:0	5.10 (5.00–5.78)	75	5.40 (5.11–6.31)	5.55 (5.34–7.10)	5.50 (5.41–6.76)	5.94 (5.56–7.28)	5.88 (5.60–7.34)	5.51 (4.76–6.16)	0.439

**Table S1 (cont.).** Content of saturated fatty acids (SFA) in DHM before (raw) and after Holder pasteurization (62.5°C, 30 minutes) or HTST treatment at 70°C (n=3), 72°C (n=4) and 75°C (n=3) for 5, 10, 15, 20, 25 seconds.

SFA	Raw	HTST treatment					Holder pasteurization	p- value*
		T <sup>a</sup> (°C)	Time (s)					
			5	10	15	20		
	Median (IQR)		Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	
C20:0	0.18 (0.14 – 0.35)	70	0.27 (0.15 – 0.36)	0.18 (0.04 – 0.25)	0.15 (0.15 – 0.18)	0.21 (0 – 0.25)	0.20 (0.15 – 0.25)	0.13 (0.08 – 0.15)
	0.14 <sup>a</sup> (0.07 – 0.17)	72	0 <sup>a</sup> (0 – 0.01)	0.37 <sup>b</sup> (0.32 – 0.41)	0.13 <sup>ac</sup> (0.05 – 0.28)	0.33 <sup>bc</sup> (0.30 – 0.38)	0.34 <sup>bc</sup> (0.33 – 0.37)	0.16 <sup>ac</sup> (0.12 – 0.23)
	0.09 <sup>a</sup> (0.06 – 0.11)	75	0.2 <sup>ab</sup> (0.2 – 0.2)	0.2 <sup>ab</sup> (0.1 – 0.2)	0.28 <sup>b</sup> (0.24 – 0.30)	0.2 <sup>ab</sup> (0.2 – 0.2)	0.2 <sup>ab</sup> (0.01 – 0.2)	0.08 <sup>a</sup> (0.07 – 0.11)

n: number of production batches analyzed; SFAs: saturated fatty acids; T: temperature.

Levels of fatty acids were expressed as percentages of total fatty acid methyl esters (FAMES); median and interquartile range (IQR) values are used when data were not normally distributed and mean and 95% confidence interval (95% CI) when they were.

<sup>a</sup>, temperature during HTST processing.

\*, Kruskal-Wallis tests were used to determine the differences between FA levels in raw and heat treated DHM when data were not normally distributed and one-way ANOVA tests when they were. Different superscript letters means difference in *post-hoc* pairwise comparison using Nemenyi test with Chi-squared approximation when data were not normally distributed and Tukey test when they were.

‡. Normally distributed.



**Table S2.** Content of monounsaturated fatty acids (MUFA) in DHM before (raw) and after Holder pasteurization (62.5°C, 30 minutes) or HTST treatment at 70°C (n=3), 72°C (n=4) and 75°C (n=3) for 5, 10, 15, 20, 25 seconds.

MUFA	Raw	T <sup>a</sup> (°C)	HTST treatment					Holder pasteurization	p- value*
			Time (s)						
			5	10	15	20	25		
C16:1	Median (IQR)		Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	
	1.75 (1.25 – 1.84)	70	1.78 (1.08 – 1.81)	1.73 (0.97 – 1.75)	1.58 (1.03 – 1.75)	1.07 (1.01 – 1.81)	1.57 (1.18 – 1.83)	1.64 (1.18 – 1.93)	0.805
	1.51 (1.39 – 1.73)	72	1.75 (1.53 – 1.91)	1.73 (1.52 – 1.91)	1.67 (1.46 – 1.83)	1.72 (1.47 – 1.90)	1.75 (1.52 – 1.92)	1.59 (1.38 – 1.82)	0.712
	1.68 (1.61 – 1.72)	75	1.70 (1.68 – 1.84)	1.77 (1.72 – 1.79)	1.76 (1.71 – 1.80)	1.90 (1.73 – 1.90)	1.81 (1.79 – 1.83)	1.62 (1.61 – 1.72)	0.082
C18:1 <i>n</i> 11	0.16 (0.06 – 0.21)	70	0.19 (0.16 – 0.27)	0.13 (0 – 0.22)	0 (0 – 0.07)	0.07 (0 – 0.11)	0.06 (0.05 – 0.16)	0.07 (0.03 – 0.14)	0.216
	0.11 <sup>a</sup> (0.05 – 0.13)	72	0.27 <sup>a</sup> (0.21 – 0.32)	0.21 <sup>a</sup> (0.19 – 0.25)	0.18 <sup>a</sup> (0.11 – 0.28)	0.26 <sup>a</sup> (0.18 – 0.32)	0.23 <sup>a</sup> (0.16 – 0.33)	0.07 <sup>a</sup> (0.04 – 0.17)	0.044
	0.10 <sup>ab</sup> (0.07 – 0.11)	75	0.19 <sup>ab</sup> (0 – 0.19)	0.14 <sup>ab</sup> (0.08 – 0.36)	0.22 <sup>ab</sup> (0.16 – 0.24)	0.22 <sup>ab</sup> (0.21 – 0.33)	0.26 <sup>b</sup> (0.25 – 0.39)	0.02 <sup>a</sup> (0.02 – 0.08)	0.040
C18:1 <i>n</i> 9	36.96 (34.57 – 42.30)	70	36.83 (34.61 – 42.55)	37.40 (34.95 – 44.65)	37.31 (34.32 – 43.56)	41.37 (34.52 – 41.60)	36.77 (36.77 – 41.96)	35.68 (34.25 – 41.96)	0.977
	35.72 (34.53 – 37.37)	72	35.27 (34.72 – 37.31)	34.85 (34.02 – 37.07)	36.14 (34.37 – 38.43)	35.21 (34.41 – 37.57)	35.42 (35.26 – 37.14)	35.47 (34.57 – 37.54)	0.992
	34.88 (32.01 – 36.64)	75	34.87 (33.45 – 35.07)	34.31 (32.11 – 36.61)	34.64 (34.14 – 36.65)	34.40 (34.16 – 35.98)	34.70 (33.80 – 36.47)	34.40 (33.27 – 36.20)	0.997

**Table S2 (cont.).** Content of saturated fatty acids (SFA) in DHM before (raw) and after Holder pasteurization (62.5°C, 30 minutes) or HTST treatment at 70°C (n=3), 72°C (n=4) and 75°C (n=3) for 5, 10, 15, 20, 25 seconds.

MUFA	Raw	T <sup>a</sup> (°C)	HTST treatment					Holder pasteurization	p- value*
			Time (s)						
			5	10	15	20	25		
C18:1 c11	Median (IQR)		Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	
	1.51 (1.45 – 1.65)	70	1.56 (1.52 – 1.73)	1.50 (1.30 – 1.55)	1.46 (1.38 – 1.47)	1.55 (0.72 – 1.58)	1.51 (1.48 – 1.52)	1.37 (1.25 – 1.42)	0.175
	1.39 <sup>a</sup> (1.17 – 1.49)	72	1.70 <sup>a</sup> (1.66 – 1.74)	1.71 <sup>a</sup> (1.63 – 1.74)	1.63 <sup>a</sup> (1.32 – 1.64)	1.68 <sup>a</sup> (1.53 – 1.73)	1.62 <sup>a</sup> (1.55 – 1.69)	1.37 <sup>a</sup> (1.31 – 1.55)	0.045
	1.26 <sup>a</sup> (0.99 – 1.39)	75	1.45 <sup>a</sup> (1.41 – 1.62)	1.62 <sup>a</sup> (1.30 – 1.69)	1.60 <sup>a</sup> (1.42 – 1.72)	1.71 <sup>a</sup> (1.47 – 1.75)	1.69 <sup>a</sup> (1.56 – 1.71)	1.22 <sup>a</sup> (1.11 – 1.42)	0.047

n: number of production batches analyzed; MUFAs: monounsaturated fatty acids; T: temperature.

Levels of fatty acids were expressed as percentages of total fatty acid methyl esters (FAMES); median and interquartile range (IQR) values are used when data were not normally distributed and mean and 95% confidence interval (95% CI) when they were.

<sup>a</sup>: temperature during HTST processing.

\*: Kruskal-Wallis tests were used to determine the differences between FA levels in raw and heat treated DHM when data were not normally distributed and one-way ANOVA tests when they were. Different superscript letters means difference in *post-hoc* pairwise comparison using Nemenyi test with Chi-squared approximation when data were not normally distributed and Tukey test when they were.

‡: Normally distributed.

**Table S3.** Content of polyunsaturated fatty acids (PUFA) in DHM before (raw) and after Holder pasteurization (62.5°C, 30 minutes) or HTST treatment at 70°C (n=3), 72°C (n=4) and 75°C (n=3) for 5, 10, 15, 20, 25 seconds.

PUFA	Raw	T <sup>a</sup> (°C)	HTST treatment					Holder pasteurization	p- value*	
			Time (s)							
			5	10	15	20	25			
n-6										
	16.75 (15.25 – 18.26)	70	16.75 (15.25 – 18.26)	16.68 (15.17 – 18.18)	16.77 (15.26 – 18.27)	15.63 (14.12 – 17.13)	17.06 (15.55 – 18.56)	15.77 (12.26 – 17.27)	0.920	
	16.19 <sup>a</sup> (15.91 – 16.46)	72	17.31 <sup>b</sup> (17.03 – 17.59)	16.97 <sup>ab</sup> (16.70 – 17.25)	16.75 <sup>ab</sup> (16.43 – 17.06)	17.33 <sup>b</sup> (17.05 – 17.60)	17.04 <sup>ab</sup> (16.77 – 17.32)	16.52 <sup>ab</sup> (16.25 – 16.80)	0.003	
	16.57 (15.31 – 17.83)	75	17.10 (15.84 – 18.36)	16.90 (15.63 – 18.16)	17.87 (16.61 – 19.13)	17.90 (16.63 – 19.16)	18.04 (16.78 – 19.30)	16.98 (15.72 – 18.24)	0.802	
C20:3 <sup>‡</sup>										
	0.26 (0.19 – 0.34)	70	0.27 (0.20 – 0.35)	0.24 (0.16 – 0.32)	0.20 (0.12 – 0.28)	0.15 (0.07 – 0.22)	0.17 (0.09 – 0.24)	0.14 (0.06 – 0.22)	0.373	
	0.16 <sup>ab</sup> (0.11 – 0.20)	72	0.24 <sup>abcd</sup> (0.19 – 0.28)	0.31 <sup>cd</sup> (0.26 – 0.35)	0.15 <sup>abc</sup> (0.09 – 0.20)	0.29 <sup>bcd</sup> (0.25 – 0.34)	0.32 <sup>d</sup> (.27 – 0.36)	0.10 <sup>abc</sup> (0.06 – 0.15)	0.000	
	0.12 <sup>ab</sup> (0.05 – 0.18)	75	0.06 <sup>a</sup> (0.00 – 0.13)	0.25 <sup>abc</sup> (0.18 – 0.31)	0.29 <sup>bc</sup> (0.23 – 0.35)	0.35 <sup>c</sup> (0.28 – 0.41)	0.35 <sup>c</sup> (0.28 – 0.41)	0.11 <sup>ab</sup> (0.04 – 0.17)	0.000	
CLA <sup>‡</sup>										
	0.16 (0.11 – 0.20)	70	0.18 (0.13 – 0.22)	0.14 (0.10 – 0.19)	0.12 (0.08 – 0.17)	0.10 (0.05 – 0.14)	0.13 (0.08 – 0.18)	0.08 (0.03 – 0.13)	0.350	
	0.12 <sup>a</sup> (0.09 – 0.15)	72	0.25 <sup>c</sup> (0.22 – 0.28)	0.25 <sup>bc</sup> (0.22 – 0.28)	0.15 <sup>ab</sup> (0.12 – 0.19)	0.23 <sup>bc</sup> (0.20 – 0.26)	0.25 <sup>bc</sup> (0.22 – 0.28)	0.12 <sup>a</sup> (0.09 – 0.15)	0.000	
	0.07 (0.01 – 0.13)	75	0.15 (0.09 – 0.21)	0.17 (0.11 – 0.23)	0.19 (0.13 – 0.25)	0.25 (0.20 – 0.31)	0.17 (0.11 – 0.23)	0.07 (0.01 – 0.13)	0.054	

**Table S3 (cont.).** Content of polyunsaturated fatty acids (PUFA) in DHM before (raw) and after Holder pasteurization (62.5°C, 30 minutes) or HTST treatment at 70°C (n=3), 72°C (n=4) and 75°C (n=3) for 5, 10, 15, 20, 25 seconds.

PUFA	Raw	T <sup>a</sup> (°C)	HTST treatment					Holder pasteurization	p-value *
			Time (s)						
			5	10	15	20	25		
	Median (IQR)		Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	
C20:4	0.28 (0.19 – 0.28)	70	0.26 (0.21 – 0.33)	0.26 (0.1 – 0.30)	0.24 (0.12 – 0.24)	0.10 (0.05 – 0.29)	0.21 (0.19 – 0.28)	0.12 (0.10 – 0.20)	0.523
	0.20 <sup>a</sup> (0.14 – 0.23)	72	0.37 <sup>b</sup> (0.33 – 0.41)	0.37 <sup>b</sup> (0.35 – 0.39)	0.30 <sup>ab</sup> (0.21 – 0.31)	0.36 <sup>b</sup> (0.34 – 0.36)	0.38 <sup>b</sup> (0.34 – 0.42)	0.18 <sup>a</sup> (0.16 – 0.23)	0.003
	0.14 <sup>ab</sup> (0.09 – 0.15)	75	0.24 <sup>bc</sup> (0.20 – 0.27)	0.10 <sup>a</sup> (0.10 – 0.11)	0.30 <sup>cd</sup> (0.29 – 0.31)	0.33 <sup>d</sup> (0.32 – 0.46)	0.35 <sup>d</sup> (0.34 – 0.43)	0.10 <sup>ab</sup> (0.1 – 0.17)	0.005
n-3									
C18:3	0.24 (0.21 – 0.44)	70	0.34 (0.32 – 0.34)	0.27 (0.17 – 0.30)	0.22 (0.20 – 0.26)	0.19 (0 – 0.29)	0.28 (0.20 – 0.29)	0.19 (0.18 – 0.19)	0.105
	0.23 (0.15 – 0.36)	72	0.37 (0.34 – 0.43)	0.41 (0.35 – 0.43)	0.41 (0.19 – 0.61)	0.40 (0.36 – 0.43)	0.40 (0.36 – 0.41)	0.25 (0.20 – 0.29)	0.172
	0.18 <sup>a</sup> (0.10 – 0.24)	75	0.2 <sup>a</sup> (0.14 – 0.23)	0.24 <sup>a</sup> (0.16 – 0.35)	0.31 <sup>a</sup> (0.24 – 0.42)	0.38 <sup>a</sup> (0.26 – 0.42)	0.34 <sup>a</sup> (0.33 – 0.35)	0.16 <sup>a</sup> (0.11 – 0.19)	0.032

**Table S3 (cont.).** Content of polyunsaturated fatty acids (PUFA) in DHM before (raw) and after Holder pasteurization (62.5°C, 30 minutes) or HTST treatment at 70°C (n=3), 72°C (n=4) and 75°C (n=3) for 5, 10, 15, 20, 25 seconds.

PUFA	Raw	T <sup>a</sup> (°C)	HTST treatment					Holder pasteurization	p- value*
			Time (s)						
			5	10	15	20	25		
	Median (IQR)		Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	
C22:6 <sup>‡</sup>	0.09 (0.07 – 0.12)	70	0.11 (0.08 – 0.13)	0.08 (0.06–0.11)	0.07 (0.04 – 0.09)	0.05 (0.02 – 0.08)	0.08 (0.05 – 0.10)	0.04 (0.01 – 0.06)	0.157
	0.09 <sup>a</sup> (0.05 – 0.12)	72	0.19 <sup>ab</sup> (0.16 – 0.22)	0.19 <sup>ab</sup> (0.16 – 0.22)	0.13 <sup>ab</sup> (0.09 – 0.17)	0.16 <sup>ab</sup> (0.13 – 0.20)	0.19 <sup>ab</sup> (0.16 – 0.23)	0.09 <sup>b</sup> (0.06 – 0.12)	0.007
	0.04 <sup>a</sup> (0.01 – 0.07)	75	0.12 <sup>ab</sup> (0.10 – 0.15)	0.13 <sup>b</sup> (0.11 – 0.16)	0.15 <sup>b</sup> (0.12 – 0.17)	0.19 <sup>b</sup> (0.16 – 0.22)	0.19 <sup>b</sup> (0.17 – 0.22)	0.05 <sup>a</sup> (0.02 – 0.07)	0.000
DHA /ARA	0.38 (0.30 – 0.43)	70	0.37 (0.37 – 0.51)	0.4 (0.30 – 0.46)	0.34 (0.31 – 0.41)	0.34 (0.29 – 0.70)	0.36 (0.28 – 0.39)	0.29 (0.28 – 0.31)	0.453
	0.46 (0.31 – 0.79)	72	0.56 (0.43 – 0.59)	0.51 (0.50 – 0.53)	0.49 (0.37 – 0.56)	0.50 (0.36–0.55)	0.53 (0.42 – 0.59)	0.48 (0.36 – 0.60)	0.974
	0.35 (0.31 – 0.42)	75	0.55 (0.44 – 0.64)	1.56 (0.97 – 1.58)	0.42 (0.40 – 0.66)	0.47 (0.46 – 0.62)	0.47 (0.43 – 0.67)	0.46 (0.28 – 0.55)	0.067

**Table S3 (cont.).** Content of polyunsaturated fatty acids (PUFA) in DHM before (raw) and after Holder pasteurization (62.5°C, 30 minutes) or HTST treatment at 70°C (n=3), 72°C (n=4) and 75°C (n=3) for 5, 10, 15, 20, 25 seconds.

PUFA	Raw	T <sup>a</sup> (°C)	HTST treatment					Holder pasteurization	p- value*
			Time (s)						
			5	10	15	20	25		
	Median (IQR)		Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	
	47.89 (36.48 – 59.29)	<b>70</b>	39.15 (27.75 – 50.56)	57.98 (46.57 – 69.38)	56.92 (45.51 – 68.32)	54.54 (40.58 – 68.51)	53.36 (41.95 – 64.76)	68.48 (57.08 – 79.88)	0.261
<b>n-6/ n-3<sup>‡</sup></b>	58.35 <sup>a</sup> (48.38 – 68.32)	<b>72</b>	32.41 <sup>a</sup> (22.44 – 42.39)	30.85 <sup>a</sup> (20.88 – 40.82)	38.50 <sup>a</sup> (26.98 – 50.02)	33.01 <sup>a</sup> (23.04 – 42.98)	31.16 <sup>a</sup> (21.19 – 41.13)	52.22 <sup>a</sup> (42.25 – 62.19)	0.041
	84.31 <sup>a</sup> (70.20 – 98.41)	<b>75</b>	55.44 <sup>ab</sup> (41.33 – 69.55)	47.65 <sup>ab</sup> (33.55 – 61.76)	41.29 <sup>ab</sup> (27.18 – 55.40)	35.49 <sup>b</sup> (21.38 – 49.60)	35.24 <sup>b</sup> (21.13 – 49.34)	84.64 <sup>a</sup> (70.54 – 98.75)	0.004

n: number of production batches analyzed; ARA: arachidonic acid; CLA: conjugated linoleic acids; DHA: docosahexaenoic acid; PUFAs: polyunsaturated fatty acids; n-3: ω-3 FAs; n-6: ω-6 FAs; T: temperature.

Levels of fatty acids were expressed as percentages of total fatty acid methyl esters (FAMES); median and interquartile range (IQR) values are used when data were not normally distributed and mean and 95% confidence interval (95% CI) when they were.

<sup>a</sup>, temperature during HTST processing.

\*, Kruskal-Wallis tests were used to determine the differences between FA levels in raw and heat treated DHM when data were not normally distributed and one-way ANOVA tests when they were. Different superscript letters means difference in *post-hoc* pairwise comparison using Nemenyi test with Chi-squared approximation when data were not normally distributed and Tukey test when they were.

<sup>‡</sup>. Normally distributed.



**IX.**

**DISCUSIÓN GENERAL**

---





El empleo de leche donada en las UCINs ha mejorado sustancialmente la evolución de los prematuros, incluyendo una reducción de la tasa de mortalidad y morbilidad, y una mayor tasa de crecimiento y desarrollo. Estos RN prematuros tienen un alto riesgo de muerte y son muy susceptibles a sufrir complicaciones médicas derivadas de la inmadurez de sus órganos y sistemas, que no permiten mantener de forma adecuada la vida en el ambiente extrauterino (de Halleux *et al.*, 2017). Los bancos de leche, en concreto, han jugado un papel decisivo haciendo llegar los beneficios de la leche humana a los prematuros que, en caso contrario, recibirían leche de fórmula ya que sus madres no han iniciado la producción de leche o la producen en cantidad insuficiente para satisfacer las necesidades del niño. Además, los bancos de leche permiten que estos beneficios se hagan extensivos a otros niños de alto riesgo, como los que han sido sometidos a cirugías.

En la actualidad hay más de 650 bancos de leche humana en todo el mundo, siendo estas entidades las principales encargadas de proporcionar la leche humana donada que se necesita en las UCINs. Pero, siguiendo las recomendaciones de influyentes organismos internacionales como la OMS (WHO, 2017), la Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátricas (ESPGHAN *et al.*, 2013), la Asociación Norteamericana de Bancos de Leche Humana (HMBANA, 2017) y la Academia Americana de Pediatría (AAP, 2012), es previsible que este número se amplíe para fomentar y facilitar la disponibilidad de leche humana donada para un mayor número de prematuros (Haiden y Ziegler, 2016).

### **IX.1. VALIDACIÓN DE UN CUESTIONARIO DE CRIBADO DE DONANTES DE LECHE SOBRE CONSUMO DE DROGAS ILEGALES, NICOTINA Y CAFÉINA**

La leche humana es un fluido biológico y, por lo tanto, existe el riesgo de transmisión de agentes infecciosos y sustancias indeseables a través de la leche donada y, aunque este riesgo probablemente sea inferior que en el caso de otros fluidos, la repercusión práctica es la misma. Para reducir este riesgo en los bancos de leche es habitual realizar un cribado de las potenciales donantes. Este cribado incluye un estudio serológico, según recomendaciones internacionales, y un cuestionario para descartar factores de riesgo y hábitos tóxicos. El perfil habitual de las donantes, según un estudio reciente realizado en la CAM, se corresponde con mujeres de unos 30 años, con estudios universitarios y con pareja estable, cuyos principales motivos para donar leche son tener una abundante producción y su deseo de ayudar a otras mujeres (Sierra Colomina *et al.*, 2014).

Muchas drogas y medicamentos ingeridos o consumidos por las lactantes pueden atravesar el epitelio de la glándula mamaria y detectarse en la leche, sin conocerse en muchos casos el posible efecto para el lactante (Fríguls *et al.*, 2010; Sachs, 2013). Sin embargo, la única información disponible sobre la posible presencia de estos compuestos, como por ejemplo drogas psicoactivas, nicotina y caféina, en la leche donada es la

proporcionada por las propias donantes. Por ello, la validación de este cuestionario de salud y hábitos de vida, que tienen que cumplimentar las mujeres lactantes para poder hacerse donantes en un banco de leche, en relación con el consumo de drogas ilegales, tabaco y bebidas con cafeína es de sumo interés. El principal resultado obtenido fue la perfecta concordancia entre las respuestas de las donantes en relación con el consumo de drogas ilegales en el cuestionario y los resultados obtenidos al analizar sus muestras de leche. La ausencia de drogas ilegales en la leche donada analizada se puede atribuir a que este colectivo de madres está especialmente sensibilizado con la lactancia materna y sus beneficios.

Por otro lado, sólo en una muestra de leche, de las 400 analizadas, se encontró nicotina y su metabolito (cotinina) a una concentración similar a la detectada por otros autores en muestras de leche procedentes de mujeres lactantes fumadoras (Dahlström *et al.*, 2008). Esta muestra procedía de una donante que había asegurado no ser fumadora en el cuestionario (1,6% de falsos negativos). Los niveles encontrados en la muestra de leche podrían deberse al tiempo que pasó desde que la donante fumó hasta que se extrajo la leche o, incluso, por una exposición pasiva al humo de tabaco (dato que no contemplaba el cuestionario). Por lo tanto, el cuestionario podría ser una herramienta más útil para estimar la presencia de nicotina en la leche si se recogiera información sobre una posible exposición pasiva al humo de tabaco.

La concentración de cafeína encontrada en la leche osciló entre 32 y 7564,26 ng/mL, en concordancia con datos de muestras de mujeres consumidoras de cafeína (Bailey, 1982; Blanchard *et al.*, 1990; Pellegrini *et al.*, 2007; Ryu, 1985; Tyralla y Dodson, 1979). La sensibilidad y la especificidad del cuestionario para detectar cafeína en la leche donada fueron del 46% y 77%, respectivamente.

Los niveles de cafeína, al igual que para la nicotina, varían dependiendo del tiempo transcurrido entre la ingesta de la bebida con cafeína y el momento de la extracción de la leche (dato que tampoco se recogía en el cuestionario). Esta información podría ser de gran interés puesto que la vida media de eliminación de la cafeína en la leche es de 5-6 h después de tomar la bebida (Berlin *et al.*, 1984; Oo *et al.*, 1995; Stavchansky *et al.*, 1988). Es posible que el 16% (4/25) de las donantes que aseguraban tomar bebidas con cafeína en el cuestionario y que en sus muestras no se detectó este compuesto se extrajeran la leche para el banco en tiempos alejados de la ingesta de la bebida.

Por otro lado, en el 63% (24/38) de las donantes que aseguraron no tomar bebidas con cafeína en el cuestionario, este compuesto se detectó en sus muestras de leche. Esto podría ser debido, en primer lugar, a que las donantes proporcionaran información falsa, lo cual parece extraño al permitirse a las donantes tomar hasta dos bebidas al día con cafeína. En segundo lugar, también sería posible que el cuestionario no recogiese la información suficiente sobre el consumo de estas bebidas, lo cual

parece más razonable. En principio, el cuestionario sólo recoge el número de cafés, té, bebidas refrescantes tipo cola o medicamentos con cafeína consumidos por día. Sin embargo, hay ciertos alimentos y bebidas que contienen cafeína que no están incluidos en el cuestionario, como son las bebidas energéticas o el chocolate empleado en postres o bebidas. En este sentido, para mejorar la calidad de los datos sobre el consumo de cafeína por parte de las donantes se debería recoger con más detalle el tipo de bebida o comida ingerida. Además, se debería estimar el volumen o gramos aproximados consumidos de este tipo de productos con cafeína. También sería útil disponer de información sobre el momento en que consumen estos productos en relación con el momento habitual de la extracción de la leche para la donación.

No obstante, teniendo en cuenta la concentración más alta de cafeína encontrada en las muestras de leche analizadas, la potencial exposición del RN a estas dosis no supondría un peligro para su salud. Hay que tener en cuenta que, habitualmente, a los RN prematuros que reciben leche donada se les pauta una dosis inicial de citrato de cafeína de 20 mg/kg, seguida de una dosis de mantenimiento de 5-10 mg/kg/día para prevenir la apnea de la prematuridad (Charles, 2008). Así mismo, y a diferencia de la teofilina, la cafeína está asociada con bajas dosis de toxicidad (Henderson-Smart y Steer, 2010).

Desde la apertura del Banco de Leche del Hospital 12 de Octubre sólo se han rechazado 13 de 568 donantes. Las principales razones para la exclusión han sido haber recibido transfusiones, tener serología positiva para hepatitis B o C, ser vegetarianas estrictas o ser fumadoras activas. Hasta el momento, ninguna donante ha sido rechazada por adicción a drogas ilegales.

Una de las principales limitaciones de este estudio es la pequeña ventana de detección en la leche materna de algunas drogas. Es decir, no se puede garantizar por completo que las donantes estuvieran expuestas a estas sustancias analizando únicamente este fluido. Para ello, sería necesario emplear otras matrices, como pelo u orina, para tener la completa confirmación (Escuder *et al.*, 2016). Por otro lado, el hecho de que las donantes estuvieran informadas del objetivo del estudio podría influir en que dejaran de tomar estas sustancias.

En conclusión, el cuestionario de un banco de leche puede ser útil para detectar el posible consumo de drogas ilegales y tabaco por parte de la donante. Sin embargo, su diseño actual proporciona una especificidad y sensibilidad bajas para detectar cafeína. Estos resultados podrían mejorar si se recogiera información acerca del tipo y volumen de bebida y comida con cafeína consumida, su método de preparación y el momento del día en que tiene lugar el consumo.



## IX.2. MEJORA DEL CONTROL DE CALIDAD DE LA LECHE DONADA MEDIANTE LA DETERMINACIÓN DE LA ACIDEZ

La acidez de la leche es, sencillamente, una medida de los grupos  $H^+$  libres presentes en la leche y de los grupos funcionales que pueden liberarlos, que se determina mediante una simple titulación. En condiciones normales, la leche tiene un cierto valor de acidez debido a las caseínas y los fosfatos, pero la degradación bacteriana de la lactosa a ácido láctico y, posiblemente una pequeña cantidad de otros ácidos, o la alteración de los lípidos provoca un aumento de la acidez titulable de la leche. Por eso, la medida de la acidez de la leche es una forma clásica de dilucidar si en una muestra de leche ha habido una proliferación excesiva de bacterias o ha tenido un manejo inadecuado. El método Dornic es la técnica más empleada para medir la acidez de la leche donada en los bancos de leche en el control de calidad. Sin embargo, se trata de un método indirecto y subjetivo. El cambio de color en la valoración y, por tanto, los grados Dornic correspondientes, difieren según la percepción del personal clínico que realice la medida. Además es un método con baja sensibilidad, requiere el uso de reactivos químicos y es destructivo.

Por otra parte, el pH representa la concentración de  $H^+$  libres en una escala logarítmica y se mide de forma mucho más sencilla que la acidez. En contraposición a la medida de la acidez con el método Dornic, la determinación del pH mediante un pH-metro, con un electrodo calibrado, es una técnica estandarizada y objetiva, con alta sensibilidad y precisión, que no requiere el uso de reactivos químicos ni destruye la muestra tras su medida, permitiendo que se emplee para otros análisis, como el del valor nutricional. Aunque relacionados, la acidez y el pH de la leche no tienen una equivalencia directa. Sería deseable determinar el valor de pH que se corresponde en grados Dornic con el límite establecido para el control de calidad de la leche donada cruda.

Según los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, a la leche donada con pH 7,12 le corresponde con un valor de acidez de 4°D. En consecuencia, la leche donada con un  $pH \geq 7,12$  se puede considerar de alta calidad. En cambio, la leche donada con 8°D se corresponde con un valor de pH de 6,57, límite por debajo del cual no sería recomendable pasteurizar la leche donada. Para establecer estos puntos de corte, se determinó si existía una correlación lineal entre los resultados de acidez obtenidos mediante la valoración por el método Dornic y la medida de pH con un pH-metro. Se encontró una alta correlación entre la medida de acidez por ambas técnicas en todas las muestras de leche donada analizadas. Además, los valores de pH obtenidos en este estudio concuerdan con los de otros autores (Hamosh *et al.*, 1996; Miranda *et al.*, 2011; Morriss *et al.*, 1986; Slutza *et al.*, 2010).

Una de las principales limitaciones de este estudio es que la correlación entre ambas medidas se ha establecido con un número relativamente reducido de muestras

de leche sin grandes variaciones en cuanto al grado de acidez. Dado que las donantes realizan un proceso de recogida y transporte muy cuidadoso de la leche, ésta no se deteriora y no se disponía, por tanto, de muestras con un alto grado de acidez Dornic.

Los resultados de este estudio permiten concluir que, para el control de calidad de la leche donada cruda que se va a someter a la pasteurización Holder, se considera como pH óptimo el intervalo entre 6,57 y 7,53, siendo esta medida de la acidez total de la leche ventajosa frente al método Dornic.

### IX.3. ADECUACIÓN DE UN EQUIPO HTST A LAS NECESIDADES REALES DE UN BANCO DE LECHE

En relación con la leche donada, existe una cierta controversia sobre la conveniencia de emplear leche cruda sin procesar o si se debe pasteurizar antes de administrarla a los prematuros. En unos pocos países, como Japón y Noruega, hay una antigua tradición de administrar la leche humana donada cruda. Este proceder tiene la gran ventaja de administrar todos los compuestos bioactivos de la leche a los prematuros, pero requiere que se realice un estricto control y un riguroso cribado de las donantes (Grøvslien y Grønn, 2009; Mizuno *et al.*, 2015). Por otra parte, hay que tener en cuenta que la leche humana donada puede actuar como un vehículo potencial de transmisión de bacterias y virus y que es un fluido biológico muy perecedero, que ha sido producido por un individuo distinto a la propia madre. Estos dos motivos explican la necesidad de procesar la leche donada para garantizar su seguridad. A pesar de algunos cambios indeseables derivados del tratamiento térmico, la leche donada pasteurizada retiene efectos beneficiosos y proporciona una notable protección a los prematuros que, de otra forma, recibirían fórmulas infantiles (Quigley y McGuire, 2014; Sisk *et al.*, 2016). Lamentablemente, los pasteurizadores comerciales que existen en el mercado en la actualidad tienen importantes limitaciones en cuanto a la retención de algunos compuestos bioactivos de la leche donada y en relación con la cantidad de leche que pueden procesar (que oscila entre 4 y 10 litros). Esto se traduce, en definitiva, en una oferta muy limitada de leche donada a escala global (Underwood, 2013).

El principal objetivo de la pasteurización es garantizar la seguridad de la leche donada para su consumo. Se ha establecido que esto requiere la destrucción de todos los patógenos que se puedan encontrar de forma habitual en la leche hasta lograr una reducción de cinco o seis ciclos logarítmicos (lo cual equivale a destruir el 99,999 o el 99,9999% de la población de microorganismos presentes). Pero las distintas combinaciones de temperatura y tiempo empleados para este tratamiento térmico son claramente insuficientes para destruir las bacterias esporuladas, que requieren temperaturas superiores a los 100°C para su eliminación (Sarkar, 2015).

Por otra parte, la eficacia de la pasteurización, o la destrucción global de los microorganismos, y la pérdida de la calidad nutricional y biológica asociada a la pasteurización dependen estrechamente tanto de la temperatura como del tiempo de tratamiento, aunque de manera distinta. Mientras que la velocidad a la que se destruyen los microorganismos aumenta muy rápidamente al aumentar la temperatura y el tiempo de tratamiento, la tasa de destrucción del valor nutritivo y biológico de la leche (desnaturalización de proteínas, destrucción de vitaminas...) lo hace, en comparación, más lentamente. Esto permite que un tratamiento térmico a mayor temperatura y menor tiempo (pasteurización HTST, 72°C durante 15 segundos) alcance el mismo objetivo de destrucción de microorganismos que otro realizado a una temperatura inferior y durante tiempo más largo (pasteurización Holder, 62,5°C



durante 30 minutos) con la ventaja de que con el primero la alteración de los compuestos con actividad biológica de la leche debida el calor será muy inferior a la del segundo.

Conviene recordar que para alcanzar el objetivo anteriormente indicado de la pasteurización, el proceso se debe llevar a cabo de tal manera que toda la leche se someta a las condiciones de procesamiento de manera uniforme, alcanzando todo el volumen de leche la temperatura adecuada y manteniendo dicha temperatura durante el tiempo establecido. Es decir, ninguna fracción de la leche debe procesarse a una menor temperatura o durante un tiempo más corto. Además, para limitar al máximo los daños asociados al calor es fundamental que tanto el calentamiento como el enfriamiento sean muy rápidos, de tal forma que la leche permanezca a la temperatura de tratamiento durante el tiempo indispensable. Para ello se requiere un intercambio de calor, con agua caliente o fría según corresponda, muy eficiente. Esto solo es posible si el equipo donde se procesa la leche donada tiene un diseño adecuado y cuidadoso.

En esta Tesis Doctoral se documenta el desarrollo de un equipo HTST que ha sido específicamente diseñado para satisfacer las necesidades que existen en un banco de leche humana para el procesamiento de la leche donada. El sistema HTST que se ha construido y que se ha presentado aquí permite realizar la pasteurización en continuo, de una forma rápida y en condiciones muy controladas, de un gran volumen (10 L/h) de leche donada que, además, puede ser variable, de acuerdo con su disponibilidad en función de las donaciones.

El calentamiento de la leche se lleva a cabo en unos cambiadores de calor que han sido diseñados y contruidos para que exista la máxima superficie de contacto entre los dos fluidos (el que deseamos calentar, la leche, y el que se emplea para su calentamiento, agua caliente) y la mínima resistencia al flujo para facilitar el intercambio de calor. La disposición en contracorriente de los flujos relativos de la leche y los fluidos empleados para su calentamiento o enfriamiento y la superficie corrugada de los tubos también contribuyen de manera significativa a aumentar la velocidad de transmisión de calor. La disposición espacial de los cambiadores de calor tiene una ligera inclinación en la dirección del flujo de la leche de tal manera que su diseño es autodrenable y el volumen muerto es mínimo (~300 mL). Todas estas características determinan que el calentamiento y el enfriamiento de la leche sean muy rápidos y que las pérdidas de leche donada durante su procesamiento sean mínimas.

Además, el tratamiento térmico es independiente del envasado, que se realiza de forma manual. Esto tiene la ventaja de permitir envasar la leche donada pasteurizada de acuerdo con las necesidades y preferencias del banco de leche.

Por otra parte, el sistema de limpieza *in situ* (CIP, del inglés *Cleaning-In-Place*), al igual que la higienización del sistema HTST completo antes de comenzar el tratamiento de la leche sin necesidad de desmontarlo y evitando la manipulación directa

de los agentes de limpieza y desinfección, contribuye a aumentar la seguridad y la calidad de la leche donada pasteurizada.

El equipo dispone de un ordenador dedicado que no está bajo el control de otro equipo informático ni acepta entradas de otros equipos (tan solo salida de información). Esto es un requisito indispensable para controlar todas las variables del proceso, en especial aquellas que se corresponden con puntos de control crítico dentro del sistema APPCC (temperatura y velocidad de flujo de la leche y de los distintos fluidos, posición de las válvulas, etc.) y mantener el registro adecuado de las mismas.

En definitiva, las principales características de esta unidad HTST son comparables a cualquier equipo a escala comercial que opere en la industria láctea. Sin embargo, es mucho más adecuado para el procesamiento de volúmenes más pequeños de leche, acordes a las necesidades de un banco de leche. Permite, por ello, proporcionar una fuente abundante, fiable y segura de leche donada pasteurizada a las UCINs. De esta manera se podría, incluso, ampliar el número de niños con acceso a leche donada, abarcando no solo los ingresados en las UCINs, sino también a los de otras unidades o situaciones que no se pueden considerar en la actualidad.



#### IX.4. EFECTO DEL TRATAMIENTO HTST SOBRE LA COMPOSICIÓN MICROBIOLÓGICA DE LA LECHE DONADA

Al realizar el análisis microbiológico de la leche humana donada utilizada en esta Tesis Doctoral en distintos medios de cultivo se comprobó que era posible aislar bacterias de las muestras tomadas de todos los lotes y en todos los medios de cultivo empleados. Este hallazgo no debe extrañar puesto que la leche materna sin procesar contiene una microbiota comensal propia conformada por distintas especies bacterianas pertenecientes a los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* y *Enterococcus*, entre otras (Fernández *et al.*, 2013).

Las elevadas concentraciones de enterobacterias, *Pseudomonas* spp. y otras bacterias Gram-negativas que se han observado en algunas muestras se puede explicar por el hecho de que las donantes extraen habitualmente la leche mediante el uso de bombas. La extracción de leche con estos dispositivos se asocia con un recuento elevado de este tipo de microorganismos, que no son miembros habituales de la microbiota de la leche humana, sino fruto de su contaminación. Estas bacterias contaminantes, que proceden del ambiente o del agua empleada para lavar las bombas (Cervia *et al.*, 2008; Cohen *et al.*, 2017; Fihman *et al.*, 2012) o de las malas prácticas higiénicas durante su extracción y/o almacenamiento (Boo *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2005), pueden persistir en las bombas utilizadas para la extracción de leche y/o en sus accesorios, incluso después de haber aplicado los protocolos de limpieza recomendados (Marín *et al.*, 2009). En consecuencia, sería deseable que se diseñasen nuevos dispositivos para la extracción de leche que se pudieran esterilizar convenientemente y someter a unos protocolos de limpieza y desinfección más eficaces.

Un aspecto muy importante a tener en cuenta es que la calidad microbiológica de la leche donada pasteurizada depende estrechamente no solo de las condiciones específicas de procesado aplicadas, sino también de la cantidad inicial de microorganismos presentes en la leche donada cruda y de las condiciones de almacenamiento. Por este motivo es fundamental que el personal del banco de leche forme adecuadamente a las donantes acerca de las medidas higiénicas recomendadas para la extracción y el almacenamiento de la leche. Se debe hacer particular hincapié en relación con el uso de las bombas porque, como se ha comentado, el riesgo de contaminación de la leche como consecuencia de su uso, es elevado. Asimismo, los profesionales del banco de leche también deben controlar la contaminación de la leche donada, tanto cruda como después de pasteurizada, durante su manejo en las instalaciones del banco de leche (Becker *et al.*, 2015).

Tan solo dos especies bacterianas (*B. cereus* y *E. faecalis*) sobrevivieron (aunque a baja concentración) en algunos lotes de leche donada después de los tratamientos HTST evaluados en esta Tesis Doctoral. Las formas vegetativas de las

bacterias comensales y contaminantes de la leche generalmente se destruyen al aplicar los procesos de pasteurización convencionales, pero aquellas especies capaces de esporular, como es el caso de *B. cereus*, suelen sobrevivir a este tratamiento (Almutawif *et al.*, 2017; de Segura *et al.*, 2012; Landers y Updegrove, 2010). Más tarde, finalizado el tratamiento, estas bacterias pueden multiplicarse en la leche pasteurizada incluso más rápidamente que en la leche cruda porque el tratamiento térmico suele dañar los principales sistemas bacteriostáticos presentes de forma natural en la leche cruda (Ford *et al.*, 1977). Por ello, es imprescindible refrigerar y/o congelar la leche donada inmediatamente después de haberla pasteurizado, porque así se puede controlar el crecimiento de cualquier microorganismo que hubiera sobrevivido a la pasteurización. Esta medida puede considerarse bastante efectiva ya que las bacterias esporuladas, aunque más resistentes que las formas vegetativas, tienen escaso potencial para multiplicarse en refrigeración, en comparación con las células vegetativas de otros microorganismos.

De acuerdo con los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, *B. cereus* es el microorganismo esporulado predominante en la leche cruda donada y, a menudo, el único en aquellas muestras en las que se detectó crecimiento bacteriano después de la pasteurización Holder (Landers y Updegrove, 2010). *B. cereus* es un microorganismo ubicuo en el medio ambiente. Está presente en el suelo, donde es muy abundante y puede completar todo su ciclo completo, pero también está muy adaptado al hospedador humano, bien como patógeno o, más frecuentemente, como miembro de la microbiota intestinal de los hospedadores sanos (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). Además, se ha encontrado en la leche de hembras sanas de macaco Rhesus (Jin *et al.*, 2011), en leche de vaca (Magnusson *et al.*, 2007) y en lotes preparados con mezclas de leche humana donada y manipulados con escasas medidas de higiene (Decousser *et al.*, 2013).

En los bancos de leche es práctica habitual que si en el control microbiológico que se realiza después de la pasteurización se detecta crecimiento bacteriano en un recipiente de leche, se rechaza todo el lote completo. Sin embargo, en un estudio previo se confirmó que todos los aislados de *B. cereus* que se detectaron en leche donada pasteurizada no tenían un elevado potencial de virulencia (de Segura *et al.*, 2012). Pero, dado que el nivel de virulencia es extremadamente variable entre las diferentes cepas (Decousser *et al.*, 2013), es necesario extremar las precauciones en lo referente a esta especie bacteriana.

A pesar de que *E. faecalis* no es una especie bacteriana formadora de esporas, se aisló de un lote de producción después de haber sido procesado a 72°C durante 5 segundos, pero se destruyó por completo después de procesar la leche a esa temperatura durante un tiempo más largo (>5 segundos) o a 75°C (independientemente del tiempo de procesado). Por lo tanto, cabe concluir que estos últimos tratamientos fueron efectivos en cuanto a la destrucción de cualquier célula vegetativa de *E. faecalis*.

que estuviera presente inicialmente en las muestras de leche humana donada cruda. Los enterococos, y en particular *E. faecalis*, son miembros naturales de la microbiota intestinal humana y de otros animales y también están ampliamente diseminados en el medio ambiente. Durante el nacimiento e inmediatamente después, los RNs se colonizan con enterococos (Gómez *et al.*, 2016; Moles *et al.*, 2015) y, aunque el riesgo de colonización con enterococos multirresistentes es mayor en los prematuros, en la mayoría de estos RNs no son causa de infección (Hufnagel *et al.*, 2007). Sin embargo, *E. faecalis* y *Enterococcus faecium* son patógenos nosocomiales oportunistas, que pueden causar sepsis de aparición tardía en los niños prematuros. Además, destacan por ser resistentes a muchos antibióticos de uso habitual, como penicilina, ampicilina, aminoglicósidos y vancomicina (Kumar *et al.*, 2015; Lister *et al.*, 2015). Por ello, la leche donada cruda debería recibir un tratamiento térmico que destruyera por completo estas especies de enterococos.

El análisis molecular de los enterococos aislados antes y después del tratamiento térmico mostró la existencia en la leche donada cruda de una cierta variedad de cepas. Algunos aislados que tenían el mismo perfil de PFGE procedían de dos lotes diferentes. Esta circunstancia se explica porque dichos lotes contenían leche de las mismas donantes. Los aislados que sobrevivieron el tratamiento térmico (70°C durante 5-25 segundos y 72°C durante 5 segundos) también se detectaron en la leche cruda empleada en el lote correspondiente, como lo demuestra la comparación de los perfiles de PFGE.

La termotolerancia de *E. faecalis* y *E. faecium* parece ser debida a la síntesis de varias proteínas de choque térmico, siendo DnaK y GroEL las mejor caracterizadas en la actualidad. Estas proteínas son chaperonas y juegan un papel fundamental en la estabilización de la conformación de un gran número de proteínas citosólicas. Entre otras funciones ayudan a que las proteínas desnaturalizadas, por ejemplo después de un tratamiento térmico, vuelvan a plegarse correctamente y evitan la agregación indebida con otras proteínas (Boutibonnes *et al.*, 1993; Martínez *et al.*, 2003; Rince *et al.*, 2000; Silva Laport *et al.*, 2003). Boutibonnes *et al.* (1993) demostraron que la resistencia al calor, en concreto al calentamiento a 60-62,5°C durante 30 minutos, de células de *E. faecalis* en la fase logarítmica de crecimiento a 37°C aumentaba cuando las células se exponían previamente a un choque térmico (45-50°C durante 30 minutos). Análogamente, Silva Laport *et al.* (2003) indicaron que algunas células de *E. faecium* permanecían viables incluso después de una incubación a 70°C durante 2 h. Considerando todos estos datos globalmente, se deduce que las condiciones empleadas para la pasteurización rutinaria de la leche donada se deben escoger cuidadosamente después de un exigente proceso de validación, como el que se describe en esta Tesis Doctoral.

La fosfatasa alcalina es una glicoproteína ligada a membranas que se encuentra en la mayor parte de los tejidos, siendo relevante para la clínica analítica como

indicador de funciones fisiológicas y ciertas enfermedades. Se desconoce qué papel exacto tiene esta enzima presente en la leche humana en la salud y en la nutrición de los RN (Bjelakovic *et al.*, 2012). En la industria láctea se ha empleado tradicionalmente para el control de los procesos de pasteurización debido a la estrecha relación que guarda su termorresistencia con las distintas combinaciones tiempo-temperatura que es necesario aplicar para lograr una correcta pasteurización (Kay y Graham, 1935). La utilidad de una enzima como indicador de un tratamiento tecnológico depende no solo de la cantidad de enzima que esté presente en la leche y de la sensibilidad del ensayo enzimático, sino también de las reducciones decimales necesarias en los microorganismos diana. Aunque en esta Tesis Doctoral se ha comprobado que la actividad de la fosfatasa alcalina en leche donada es variable, no se detectó ninguna actividad residual después de someter la leche donada a un tratamiento HTST a 72 o 75°C, independientemente del tiempo de tratamiento. Además, en el tratamiento HTST a 70°C se observó una inactivación progresiva al aumentar el tiempo de tratamiento. Por lo tanto, la fosfatasa alcalina no parece ser un buen indicador de pasteurización correcta de la leche donada, ya que se destruye completamente con tratamientos térmicos más suaves (72°C, 5-10 s) que los requeridos para lograr una seguridad microbiológica (72°C, 15 s).

En la industria láctea se sabe desde hace bastante tiempo que la fosfatasa alcalina se reactiva en algunas ocasiones y, por ello, se han buscado enzimas endógenas alternativas que se puedan utilizar como indicadores de una correcta pasteurización. La  $\gamma$ -glutamyl transpeptidasa o GGTP es otra glicoproteína asociada a los tejidos de los mamíferos que se encuentra tanto en la fracción de la leche desnatada como ligada a la membrana del glóbulo graso. Parece que esta enzima es la alternativa más prometedora para ser utilizada para el control de la pasteurización de la leche (Fox y Kelly, 2006). La GGTP es más termorresistente que la fosfatasa alcalina, pero su actividad a 72°C se pierde progresivamente cuando la leche donada se calienta durante periodos de tiempo más largos. Sin embargo, cuando la leche donada se procesa a 75°C su actividad se pierde por completo. Teniendo en cuenta estos resultados, la GGTP podría ser un indicador de pasteurización de la leche donada. El cambio en la actividad de las enzimas fosfatasa alcalina y  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasa como consecuencia del calentamiento HTST es muy parecido al descrito por otros autores (Dhar *et al.*, 1996) en leche donada. Estos ensayos tienen la ventaja de su relativa rapidez, ya que permiten disponer de un resultado preliminar sobre la efectividad de la pasteurización en un periodo de tiempo muy corto para comenzar a tomar decisiones sobre el lote procesado en el banco de leche. Aunque, por supuesto, sería absolutamente indispensable confirmar dicha efectividad mediante el análisis microbiológico pertinente de la leche pasteurizada. Sin embargo, debería comprobarse la cinética de inactivación completa de estas enzimas antes de poder explotar esta potencial aplicación. En la práctica diaria, los resultados del ensayo (colorimétrico) de la actividad de estas enzimas resultarían rápidos, simples y económicos.

El tratamiento térmico de la leche dispara distintas reacciones químicas en las que está implicada la lactosa como, por ejemplo, su isomerización y la reacción de Maillard por condensación con las proteínas. La magnitud de esas reacciones, así como de los cambios asociados, depende mucho de las condiciones de procesado (Olano *et al.*, 1989). La lactulosa, que generalmente se forma por isomerización de la lactosa, no se encuentra de forma natural en la leche y no se encontró en esta Tesis Doctoral en ninguna de las muestras de leche donada después del tratamiento térmico. Este compuesto, cuantificado en otros estudios mediante métodos enzimáticos y espectrofotométricos, se había propuesto como indicador de proceso para leches comerciales de vaca obtenidas por pasteurización y tratamiento térmico intenso (UHT, por sus siglas en inglés de *Ultra High Temperature*) (Marconi *et al.*, 2004).

Por otra parte, la reacción de Maillard se relaciona con el sabor a cocido y la pérdida del valor nutricional de la leche, así como con la formación de nuevos compuestos como la furosina. A diferencia de lo observado con la lactulosa, la furosina se detectó tanto en la leche pasteurizada con el método Holder como en todas las muestras de leche donada sometidas a cualquier tratamiento HTST. La concentración de furosina en la leche pasteurizada Holder y en la tratada por calentamiento HTST fue superior en unas 2× y 1.5× veces, respectivamente, a la encontrada en la leche donada cruda. Sin embargo, estas diferencias estadísticamente significativas, que probablemente sean el reflejo de la gran sensibilidad de la técnica analítica empleada, no tienen ninguna relevancia práctica.

Considerados estos resultados en conjunto, puede concluirse que la ausencia de lactulosa y la baja concentración de furosina detectada después del tratamiento HTST indican claramente que este tratamiento térmico no provoca un daño térmico significativo en la leche donada así tratada.





## IX.5. EFECTO DEL TRATAMIENTO HTST SOBRE LOS COMPUESTOS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA LECHE DONADA

Los neonatos inmaduros están expuestos a un amplio y desafiante espectro de microorganismos y alérgenos nada más nacer. Durante este periodo, en el que su vulnerabilidad es extrema, la leche materna les proporciona un gran número de compuestos con actividades biológicas variadas como, por ejemplo, inmunológicas, antiinflamatorias y antiinfecciosas (Ballard y Morrow, 2013). Algunos de estos compuestos suplementan la protección inmunológica a nivel de las mucosas mientras que otros son inmunomoduladores o estimulan el crecimiento. En conjunto, todos contribuyen al correcto desarrollo de las barreras mucosas y del sistema inmunológico del niño (Kainonen *et al.*, 2013; Lawrence y Pane, 2007; M'Raber *et al.*, 2008; Turfkruyer y Verhasselt, 2015; Verhasselt, 2010). En general, esa vasta dotación de compuestos con actividad biológica parece ser responsable de la protección duradera y sin precedentes que la leche humana confiere a los niños frente a una gran variedad de enfermedades, tanto en los países en vías de desarrollo como en los desarrollados (aunque esta terminología para clasificar los países se ha tildado de caduca y sin utilidad) (Binns *et al.*, 2016; Lodge *et al.*, 2015; U.S. Department of Health and Human Services, 2011). Por lo tanto, la glándula mamaria se puede considerar realmente como una parte relevante del sistema inmunológico del niño, en el que el calostro y la leche materna proporcionan tras el nacimiento el vínculo que impulsa el diálogo inmunológico entre la madre y el niño (Bourges *et al.*, 2008; Brandtzaeg, 2010). La protección inmunológica y la programación de las células del sistema inmunológico que confiere la leche humana mientras el RN madura y se adapta al ambiente extrauterino es especialmente relevante para los niños prematuros porque tienen al nacimiento un menor número de células inmunológicas, una menor capacidad funcional y una respuesta inflamatoria carente de regulación en comparación con los niños nacidos a término (Gregory y Walker, 2013; Lewis *et al.*, 2017).

La protección que la leche proporciona a los niños frente a las enfermedades infecciosas se basa en su mayor parte en la transferencia pasiva de grandes cantidades de Igs específicas frente a muy distintos microorganismos que compensan, en gran medida, la deficiencia en la síntesis de Igs durante el primer año de vida del niño (Hill y Newburg, 2015). Además, los anticuerpos presentes en la leche humana promueven la homeostasis intestinal a largo plazo al regular la microbiota intestinal y la expresión génica en el epitelio intestinal (Rogier *et al.*, 2014). Estas acciones y efectos son posibles gracias a que las Igs son bastante resistentes a la digestión gástrica infantil y su glicosilación puede reducir, aún más, su digestibilidad y ayuda a preservar las regiones de unión al antígeno que son necesarias para su actividad (Zhang *et al.*, 2014).

La clase más abundante de Igs en la leche humana es la SIgA). Su papel en la prevención de enfermedades infecciones respiratorias y gastrointestinales en los

lactantes está perfectamente documentado (Brandtzaeg, 2003). Además, las SIgAs tienen un papel relevante en la regulación de la respuesta inmunológica frente a los antígenos de la dieta. De hecho, varios estudios epidemiológicos han descrito la existencia de una relación inversa entre los niveles de las SIgAs en la leche materna y el desarrollo de alergia (Jarvinen *et al.*, 2000; Savilahti *et al.*, 2005). Se debe remarcar que tanto la cantidad como la diversidad de IgAs que producen los RNs son claramente deficientes porque todavía no se han generado las células de memoria por falta de exposición a los antígenos. Por otra parte, la transferencia a través de la placenta de IgAs es muy escasa en la especie humana, sobre todo en comparación con la de IgGs. Esta situación se agrava en los prematuros porque aunque estén expuestos muy pronto a microorganismos y antígenos extraños (en relación con su edad gestacional), esta exposición no acelera la expresión del conjunto de genes implicados en la producción de IgAs (Zasada *et al.*, 2014).

Las IgMs también tienen un importante papel para la salud del neonato dado que intervienen en la opsonización de las bacterias patógenas Gram-negativas (Brandtzaeg y Johansen, 2007; Lawrence y Pane, 2007). Al igual que se había indicado para las IgAs, la producción de IgGs por parte de los niños es escasa para mantener una homeostasis adecuada durante la primera etapa de su vida. La transferencia a través de la placenta de IgGs tan solo corrige esta deficiencia en parte porque las IgGs transferidas disminuyen rápidamente después del nacimiento. Esto hace que los niños sean particularmente sensibles a los microorganismos encapsulados (Lawrence y Pane, 2007). Todos estos hechos refuerzan el valor de la leche humana para los neonatos y, en particular, para los que nacen prematuramente.

El nivel de Igs en la leche humana es muy variable y depende, entre otros factores, de la etapa de la lactancia. La concentración de Igs en leche disminuye muy rápidamente durante las primeras cuatro semanas posteriores al parto (Weaver *et al.*, 1998). La variabilidad del contenido de IgA en las muestras de leche donada analizadas en esta Tesis Doctoral (381,51–694,43 mg/L) es similar a los valores obtenidos por otros investigadores en la leche madura (247–488 µg/mL) (Agarwal *et al.*, 2011; Permanyer *et al.*, 2010). Igualmente, la ventaja que ofrece el tratamiento HTST sobre la pasteurización Holder en cuanto a la conservación de las IgAs que se ha registrado en esta Tesis Doctoral también ha sido mostrada anteriormente (Dhar *et al.*, 1996; Giribaldi *et al.*, 2016; Goldblum *et al.*, 1984; Hamprecht *et al.*, 2004).

En contraposición, no existía información sobre el efecto de los tratamientos HTST en el resto de las clases de Igs, como IgG e IgM. Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral indican que el tratamiento HTST ofrece una ventaja, que es estadísticamente significativa, sobre la pasteurización Holder en cuanto a la conservación de estas dos clases de Igs. En estudios anteriores, en los que se evaluaba su estabilidad durante la pasteurización Holder, se había concluido que las IgMs eran muy sensibles al mismo, mientras que la sensibilidad de las IgGs a este tipo de

pasterurización era algo más moderada (Ford *et al.*, 1977; Liebhaber *et al.*, 1977; Evans *et al.*, 1978; Contador *et al.*, 2013; Espinosa-Martos *et al.*, 2013).

Al analizar los resultados obtenidos sobre la inactivación de las Igs se observó una gran variabilidad en la pérdida de actividad en los distintos lotes de leche donada sometidos al mismo tratamiento térmico. Esta variabilidad podría estar relacionada con las distintas concentraciones iniciales existentes en las muestras de leche donada cruda puesto que la desnaturalización proteica depende de la concentración de proteína (Weber y Drickamer, 1983). De hecho, este resultado concuerda con los obtenidos en numerosos estudios anteriores en los que se constataba una gran variabilidad en la concentración de Igs presente en las muestras después de la pasteurización Holder (Peila *et al.*, 2016).

La leche humana es rica en factores de crecimiento, como el TGF- $\beta_2$  y el EGF. La presencia de una concentración elevada de TGF- $\beta_2$  es un rasgo habitual en la leche humana en condiciones fisiológicas (Verhasselt, 2010). El TGF- $\beta$  se considera como un factor inmunomodulador clave en la leche humana y su importancia se hace patente por el hecho de que la síntesis endógena de TGF- $\beta$  en el intestino del neonato es deficiente (Penttilä *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2000; Veldhoen *et al.*, 2006). Este factor modulador clave confiere protección frente al asma y la dermatitis atópica en los niños alimentados con lactancia materna (Kalliomaki *et al.*, 1999; Oddy *et al.*, 2003) y desempeña un papel primordial en la inducción de la tolerancia oral y la regulación general de la respuesta inmunológica intestinal después de la ingestión de alimentos (Faria y Weiner, 2006; Penttilä, 2010). Además, el TGF- $\beta_2$  actúa específicamente atenuando la respuesta inflamatoria inducida por la IL-1 $\beta$ . Por otra parte, regula la homeostasis en el intestino inmaduro a través de los niveles de IL8, después de la interacción con las endotoxinas (Nguyen *et al.*, 2014; Rautava *et al.*, 2011).

El EGF presente en la leche humana tiene un papel protector frente a graves enfermedades neonatales intestinales, como la NEC, debido a su conocido papel en el cambio del balance de proteínas pro- y antiapoptóticas (Clark *et al.*, 2005; Nair *et al.*, 2008). La NEC generalmente se asocia con la prematuridad y, por ello, su prevención es de suma importancia para las UCINs y, en consecuencia, para los bancos de leche humana. Además, el EGF potencia la proliferación y la diferenciación de las células epiteliales en el tracto gastrointestinal, tiene un efecto notable en la cicatrización de la mucosa dañada después de una lesión y puede contribuir al aumento de tamaño del timo que se observa en los lactantes (Dvorak, 2010; Hasselbalch *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 1999; Warner y Warner, 2005).

Respecto de las tasas de retención del TGF- $\beta_2$ , después de la pasteurización Holder de muestras de leche donada dichas tasas fueron, en general, inferiores a las registradas después de cualquier tratamiento HTST (70, 72 o 75°C durante 5-25 segundos). Sin embargo, esta diferencia entre tratamientos no llegó a ser significativa

( $p > 0.05$ ) porque se registró una elevada variación en las tasas de retención en cada uno de los distintos tratamientos. Esta variabilidad tan marcada unida, en algunos casos, al aumento de la concentración relativa de TGF- $\beta_2$  registrado después de realizar el tratamiento térmico probablemente esté relacionada con la liberación de TGF- $\beta_2$  de las células somáticas durante el almacenamiento en congelación o con la activación parcial que tiene lugar cuando se calienta a 60-100°C durante 1-10 minutos (Brown *et al.*, 1990; McPherson y Wagner, 2001). Por otra parte, la TGF- $\beta_2$  es muy hidrofóbica, mientras que la concentración que se mide con el ensayo es la correspondiente a las moléculas que quedan retenidas en la fase acuosa de las muestras tratadas. Los resultados obtenidos, globalmente, indican que la tasa de retención de TGF- $\beta_2$  fue mayor cuando los tratamientos HTST se realizaban a menor temperatura y que dicha tasa disminuía al aumentar la temperatura y/o el tiempo de tratamiento. Estas observaciones concuerdan con los resultados obtenidos por otros autores (McPherson y Wagner, 2001).

En cambio, la tasa de retención del EGF no cambió significativamente ni después de la pasteurización Holder ni después de cualquier modalidad del tratamiento HTST. Esta remarcable estabilidad térmica, que ha sido descrita con anterioridad, podría estar relacionada con el patrón de puentes disulfuro que tiene la molécula. Dicho patrón determina que la estructura terciaria del EGF tenga una notable estabilidad conformacional (Chang y Li, 2002; Espinosa-Martos *et al.*, 2013; Goelz *et al.*, 2009). Además, esta estabilidad conformacional es un rasgo muy importante también desde el punto de vista fisiológico porque asegura que el EGF sea resistente a las condiciones con las que se encuentra durante su tránsito por el tracto gastrointestinal del niño y podría explicar, al menos parcialmente, el papel preventivo que tiene la leche donada frente a la NEC (Good *et al.*, 2016).

La presencia de hormonas y de factores de crecimiento en la leche humana se ha relacionado con la función de la glándula mamaria como una extensión extrauterina, o un sustituto, de la placenta para ayudar en el correcto desarrollo y crecimiento del RN (Grosvenor *et al.*, 1993). Las hormonas que se encuentran en la leche regularían la actividad de varios órganos y tejidos del lactante hasta que se completase la maduración y comenzara a funcionar a pleno rendimiento su propio sistema endocrino.

La identificación en la leche de hormonas como la leptina, la ghrelina y la adiponectina, implicadas en la regulación del balance energético y el desarrollo metabólico de los neonatos, ha despertado un gran interés en el marco actual en el que el síndrome metabólico y la obesidad han alcanzado proporciones epidémicas en casi todos los países. Lógicamente, los BLH no se quedan al margen en este interés (Çatlı *et al.*, 2014; Demmelmair y Koletzko, 2016; Savino *et al.*, 2010). En la mucosa gastrointestinal se han identificado receptores específicos para estas hormonas, sugiriendo que intervienen en la estimulación del crecimiento y el desarrollo del tracto gastrointestinal (Bielicki *et al.*, 2009). Por lo tanto, no es extraño que la lactancia

materna se haya asociado con una cierta protección frente a una ganancia muy rápida de peso y, en consecuencia, a la obesidad infantil (Kiersen *et al.*, 2006). Sin embargo, el papel protector de la lactancia frente a la obesidad, probablemente no solo se explique por el contenido hormonal de la leche, sino también por su contribución al desarrollo del microbioma intestinal infantil y de las preferencias gustativas (Woo y Martin, 2015).

La leptina, que tiene un efecto anorexigénico (o supresor del apetito), influye en la regulación a corto y largo plazo del balance energético y de la ingesta de alimentos. Esta hormona se puede transferir de la sangre a la leche a través de las células epiteliales de la glándula mamaria. Pero, además, también se puede producir en la propia glándula mamaria y ser secretada en los glóbulos grasos por las células epiteliales durante la lactancia (Bonnet *et al.*, 2002; Savino *et al.*, 2016). De hecho, los niveles de leptina en la leche humana entera son entre 2 y 66 veces más altos que en la desnatada (Savino *et al.*, 2009). Esta hormona es el componente de la leche humana que tiene una asociación más estrecha con el IMC materno (Savino *et al.*, 2016). El contenido de leptina en la leche humana se correlaciona positivamente con los niveles de leptina en suero del lactante y estos últimos lo hacen con el IMC y peso del niño (Savino *et al.*, 2016). La existencia de receptores de leptina en el epitelio intestinal sugiere que esta hormona podría pasar de la leche materna a la sangre del niño a través de la barrera intestinal, para regular la saciedad en esta crítica etapa neonatal (Barrenetxe *et al.*, 2002).

La adiponectina juega el papel opuesto a la acción de la leptina, con un efecto estimulante del apetito y participando en la regulación del metabolismo energético. De todas las hormonas que intervienen en el control del apetito la adiponectina es la más abundante inicialmente en la leche humana, pero su concentración se reduce progresivamente a lo largo de la lactancia (Gridneva *et al.*, 2016; Newburg *et al.*, 2010). Además, tiene una elevada biodisponibilidad que se relaciona, por un lado, con una intensa glicosilación que le permite sobrevivir a las condiciones del tracto digestivo del niño y, por otro, con la presencia de receptores de adiponectina en el epitelio intestinal infantil (Newburg *et al.*, 2010). La adiponectina se encuentra naturalmente como un oligómero, en concreto como múltiplos de tres unidades ensamblados de forma similar a como lo hacen las triples hélices de colágeno. El grado de polimerización de la adiponectina es importante porque los distintos oligómeros tienen distintas funciones que, en ocasiones, pueden ser incluso opuestas. La estructura de la adiponectina que se encuentra en la leche humana se corresponde con el oligómero de 18 unidades. Ésta es la forma que se asocia con la actividad más intensa en cuando a la regulación de muchos procesos metabólicos (Woo *et al.*, 2009). La concentración de adiponectina en la leche humana se relaciona directamente con la concentración de adiponectina en el suero e inversamente con la adiposidad de los niños durante los seis primeros meses de vida, sugiriendo un importante papel en la regulación inicial de la ganancia de peso del niño después del nacimiento (Newburg *et*

*al.*, 2010). También se ha sugerido que podría tener un papel adicional, atenuando el proceso inflamatorio de la mucosa intestinal en los lactantes (Newburg *et al.*, 2010).

Otra hormona que estimula el apetito y se encuentra en la leche humana es la ghrelina. Hay datos que confirman su síntesis en la glándula mamaria, pero no se conoce con certeza si se transporta desde la sangre hacia la leche a través de las células epiteliales (Bonnet *et al.*, 2002; Kierson *et al.*, 2006). Esta hormona está implicada en la regulación de la ingesta a corto plazo y en la regulación del peso y el metabolismo energético a largo plazo (Çatlı *et al.*, 2014). Los niveles de ghrelina en la leche humana aumentan progresivamente a partir del nacimiento hasta, al menos, los 6 meses posparto. Sin embargo, no hay una evidencia clara que relacione su concentración en leche con algún beneficio específico para el niño (Fields *et al.*, 2016). Esta hormona es un pequeño péptido de 28 aminoácidos que está *n*-octanoilado. Esta modificación, que es esencial para su actividad, determina su elevada afinidad por las membranas y explica por qué los niveles de ghrelina son más altos en la leche entera que en la desnatada (Kierson *et al.*, 2006; Kojima y Kangawa, 2005). Por lo tanto, es posible que los niveles de ghrelina detectados en las muestras de leche analizadas en esta Tesis Doctoral, después de la etapa preparatoria de centrifugación, sean más bajos que los presentes realmente en las muestras de leche entera, que es lo que consumen los lactantes.

La leptina fue muy sensible al tratamiento térmico y no se detectó en ninguna de las muestras de leche donada después de la pasteurización Holder. Los porcentajes de retención detectados en las muestras de leche después de los tratamientos HTST fueron los más bajos en comparación con el resto de las hormonas analizadas en esta Tesis Doctoral. En contraposición, la ghrelina y la adiponectina no solo no fueron destruidas por ninguno de los tratamientos térmicos aplicados, sino que su concentración aumentó tanto después de la pasteurización Holder como después de los tratamientos HTST. Este resultado puede relacionarse con la disociación de la adiponectina que pasa de la forma trimérica a la monomérica (Woo *et al.*, 2009). También puede contribuir a este aumento la ruptura de la membrana celular de las células epiteliales que se encuentran en la leche donada después del tratamiento térmico, que favorecería la liberación de estas hormonas.

Los datos disponibles sobre el impacto de la pasteurización en la concentración de estas hormonas en la leche son dispares. Mientras que algunos autores han indicado que los niveles de adiponectina e insulina disminuyen como consecuencia de este tratamiento (Ley *et al.*, 2011), otros no han encontrado diferencias en la concentración de leptina después de la pasteurización Holder (Chang *et al.*, 2013). Por otra parte, no hay certidumbre sobre el significado biológico de los cambios que se observan en los niveles de las hormonas que regulan el apetito en esta etapa tan temprana de la vida. Probablemente esta falta de conocimiento esté relacionada con la imposibilidad de hacer estudios aleatorizados con distintos tratamientos. Además, no se puede olvidar

que existe un elevado número de factores maternos e infantiles que influyen tanto en los niveles de compuestos bioactivos de la leche materna como en sus funciones una vez que se encuentran en el intestino infantil. Por lo tanto, es muy difícil relacionar de forma inequívoca la variación de un compuesto con una consecuencia específica en el niño (Ehrenthal *et al.*, 2016; Fields *et al.*, 2016).

El tratamiento térmico de la leche siempre provoca algunos cambios indeseables, estando su magnitud relacionada con la temperatura y la duración del calentamiento, como se ha indicado anteriormente. Dejando aparte la pasteurización HTST, que constituye una mejora sustancial del tratamiento térmico de la leche donada, se han propuesto otras alternativas que no se basan en el empleo de calor, como por ejemplo las altas presiones hidrostáticas o la radiación UV-C. Estas alternativas parecen conservar mejor los componentes biológicos de la leche, como las IgA totales o la actividad de la lisozima en comparación con la pasteurización Holder (Christen *et al.*, 2013; Mayayo *et al.*, 2015; Sousa *al.*, 2016). Sin embargo, es necesario conocer con más detalle la influencia que puedan tener en otros componentes de la leche, además de realizar un exhaustivo análisis microbiológico antes de que se puedan aplicar en la práctica para el tratamiento de la leche donada.





## IX.6. EFECTO DEL TRATAMIENTO HTST SOBRE LA COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DE LA LECHE DONADA

En esta Tesis Doctoral también se han evaluado los cambios registrados en los nutrientes de la leche donada después de haber sido sometida a un tratamiento HTST en un equipo operativo en un banco de leche. Además, dichos cambios se han comparado con los experimentados después de una pasteurización tradicional con el método Holder. Globalmente, no se encontraron cambios indeseables ni en los principales macronutrientes (grasa, lactosa y proteína) ni en algunos compuestos minoritarios como la glucosa, el *mio*-inositol, AGs relevantes y vitaminas.

Los prematuros tienen unos requerimientos nutritivos complejos para hacer frente con su elevada tasa metabólica, su crecimiento y el desarrollo inmunológico y cognitivo, entre otros requerimientos, y alcanzar el crecimiento y una composición corporal similar a la del feto con la edad gestacional equivalente. La leche de la propia madre es la alimentación recomendada para proporcionar los nutrientes requeridos tanto por el RN a término como por el pretérmino (Agostoni *et al.*, 2010). Se asume que la leche donada confiere ventajas para la salud similares a las referidas para la leche de la propia madre, en particular para los prematuros (ESPGHAN *et al.*, 2013).

El contenido de grasa, proteína y lactosa totales en la leche donada medido por espectrofotometría de FTIR y registrado en este estudio (2,83-3,98 g/dL para la grasa, 1,60-2,07 g/dL para la proteína y 7,41-7,98 g/dL para la lactosa) concuerdan con los valores indicados por otros autores (Ballard y Morrow, 2013; Martin *et al.*, 2016).

La grasa de la leche humana proporciona entre el 40 y el 55% de la energía total que suministra la leche, siendo uno de los nutrientes más básicos para el niño (Koletzko, 2016). Además, los lípidos son fundamentales para la síntesis de las membranas celulares y su metabolismo genera muchos lípidos bioactivos que juegan un papel clave como mediadores de las rutas de señalización (Koletzko, 2016). En general, la composición de la leche donada es muy parecida a la de la leche humana recién extraída excepto, precisamente, en cuanto al contenido en grasa. En la leche donada el contenido de grasa generalmente es más bajo que el de la leche recién extraída (3,5-4,5%; Martin *et al.*, 2016). Esto se ha relacionado con la fuerte adherencia de la grasa de la leche a las superficies de los contenedores, dado que la leche humana no está homogenizada y se transfiere varias veces durante su manipulación tanto en casa como en el banco de leche (Maffei y Schandler, 2017). Además, los cristales de hielo y de grasa que se forman durante la congelación pueden romper la membrana del glóbulo graso y liberar grasa que se pega fácilmente a las superficies de plástico, como se ha indicado anteriormente (Arnold, 2010; Vázquez-Roman *et al.*, 2014). La reducción del contenido de grasa de la leche donada es importante porque los prematuros tienen unos elevados requerimientos energéticos no sólo para su crecimiento, sino también para la regulación de la temperatura y hacer

frente a otros factores estresantes. Esto resalta la necesidad de un ajuste personalizado de la nutrición, analizando individualmente los nutrientes y el contenido de energía de cualquier dosis de alimentación, tanto de leche de la propia madre como de leche donada, para determinar la conveniencia de fortificarla para asegurar el crecimiento y composición corporal óptimos en los niños pretérmino (Wojcik *et al.*, 2009; Brennan *et al.*, 2016).

La lactosa es el macronutriente que proporciona la segunda fuente de energía en importancia de la leche humana. Se hidroliza a glucosa y galactosa gracias a la lactasa presente en el borde en cepillo del intestino delgado. La glucosa es el principal carbohidrato que circula en el cuerpo del prematuro, así como la fuente de energía primaria para el cerebro de estos niños (Agostoni *et al.*, 2010). Aunque la actividad de la lactasa aumenta rápidamente después del nacimiento, en los prematuros esta actividad es baja (Kien, 1990). La dificultad para digerir y absorber la lactosa podría favorecer el desarrollo de NEC, ya que esta condición se ha relacionado con una disbiosis en el intestino inmaduro del prematuro (Kien, 2006; Neu y Pammi, 2017). Sin embargo, debe considerarse que la leche humana ofrece protección al prematuro frente a la NEC debido a un gran número de factores como SIgAs, lactoferrina, lisozima, lipasa activada por las sales biliares, factores de crecimiento, HMOs, células del sistema inmunológico y microbiota (Neu y Pammi, 2017; Underwood, 2013).

En los prematuros se ha descrito que la mejor tolerancia a la alimentación enteral se asocia con la alimentación trófica, definida como la administración de pequeñas cantidades de leche de la propia madre o de leche donada. Estos pequeños volúmenes de leche humana estimulan la maduración y la movilidad intestinal, inducen la actividad de la lactasa, además de la de otras enzimas, y promueven la liberación de hormonas a nivel intestinal (McClure y Newell, 2002; Patole, 2005;).

Las proteínas de la leche humana proporcionan aminoácidos que serán usados como bloques de construcción para la síntesis proteica, pero también tienen funciones antimicrobianas e inmunomoduladoras y estimulan la absorción de nutrientes (Martin *et al.*, 2016). El contenido en proteína de la leche humana disminuye a lo largo de las primeras 4-6 semanas y/o en aquellas madres que producen un elevado volumen de leche (Ballard y Morrow, 2013). Por estos motivos, la leche donada, que generalmente es leche madura cedida por mujeres que tienen la lactancia bien establecida y una producción abundante de leche, generalmente tiene una concentración de proteína insuficiente para la alimentación de los prematuros, que requieren entre 3,5 y 4 g de proteína/kg de peso corporal diariamente (Hay y Thureen, 2010). La suplementación con proteína de la alimentación de los prematuros mejora el crecimiento a corto plazo y también los resultados en el neurodesarrollo a largo plazo (Schanler, 2011).

Varios estudios han abordado el efecto de la pasteurización Holder en los macronutrientes de la leche, mostrando que no se producen cambios en la

concentración de proteína y lactosa (de Segura *et al.*, 2012; Espinosa *et al.*, 2013; García-Lara *et al.*, 2013; Goes *et al.*, 2002; Silvestre *et al.*, 2006) pero si una reducción significativa en el contenido total de grasa (García-Lara *et al.*, 2013; Vieira, 2011) en leche donada. En cambio, otros investigadores no han observado modificación significativa en los niveles de grasa (Fidler *et al.*, 2001; Goes *et al.*, 2002; Henderson *et al.*, 1998; Lepri *et al.*, 1997). Estas discrepancias podrían estar relacionadas con la técnica empleada para la preparación de la muestra antes de su análisis o, incluso, con la técnica analítica empleada. En esta Tesis Doctoral el contenido global de nutrientes de la leche donada se determinó empleando un analizador que mide en el rango IR medio y no se observó ningún cambio significativo en cuanto a la concentración de proteína, grasa o lactosa en las muestras de leche donada pasteurizadas con el método Holder o tratadas con el sistema HTST en comparación con las muestras de leche cruda.

Los analizadores basados en el IR medio se utilizan con mucha frecuencia en la industria láctea porque el enlace carbono-hidrógeno, el enlace amida y los grupos hidroxilo absorben la energía en el rango IR medio a diferentes longitudes de onda (3,48  $\mu\text{m}$ , 6,465  $\mu\text{m}$ , y 9,610  $\mu\text{m}$ , respectivamente) y son los principales grupos funcionales que representan a la grasa, proteína y lactosa de la leche, respectivamente (Lefier *et al.*, 1996). Cuando los analizadores IR, que se desarrollaron originalmente para la industria láctea, se aplican para el análisis de la leche humana los equipos deben validarse por las diferencias en la proporción de caseínas/proteína total y de HMOs/lactosa, así como en el perfil de AGs (Fusch *et al.*, 2015). Precisamente esto fue lo que se hizo con el analizador de leche empleado en este estudio.

La diferencia registrada entre la concentración de lactosa en las muestras de leche donada cruda medida con el analizador de IR medio (7,65 g/dL) y la medida por cromatografía de gases (6,55 g/dL), que es mucho más específica, podría deberse a la inclusión de los carbohidratos distintos de la lactosa, principalmente HMOs, en el primer caso (analizador IR medio). De hecho, se comprobó que HMOs purificados absorbían en la misma región del espectro IR medio que la lactosa (datos no mostrados). Los HMOs se identifican con mucha facilidad por espectrometría de masas (MS, por sus siglas en inglés) y espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), pero esas tecnologías no se pueden adaptar fácilmente a la práctica clínica. En cambio, la espectrofotometría en el IR medio es muy adecuada para este propósito debido al pequeño volumen de muestra que se requiere y la rapidez con que se realiza el análisis. Además, la técnica FTIR genera el espectro completo en el rango IR medio y tiene el potencial de desarrollar algoritmos que podrían emplearse para calcular la concentración de otros componentes, como por ejemplo los HMOs, si se llegan a identificar regiones con longitudes de onda lo suficientemente sensibles. Las técnicas MS y RMN se podrían emplear como herramientas para la validación, lo cual aumentaría el futuro valor clínico de la técnica FTIR (Fusch *et al.*, 2015; Smilowitz *et al.*, 2014). La concentración de HMOs en leche humana varía a lo largo de la lactancia

y disminuye desde unos 23 g/L en el calostro hasta 7 g/L en la leche madura (Bode, 2012). Los HMOs modelan la microbiota intestinal del neonato y protegen frente a la NEC, la candidiasis y otras enfermedades de carácter inmunológico. Lamentablemente la práctica clínica actual en las UCINs no considera la suplementación de la alimentación del neonato con este componente bioactivo (Moukarzel y Bode, 2017). El contenido de HMOs en la leche de madres de niños prematuros es bajo y su composición muy variable, especialmente la fracción de HMOs fucosilados. Este rasgo de la composición de la leche se ha relacionado con una mayor susceptibilidad de los prematuros a la disbiosis intestinal y con un mayor riesgo de sufrir infecciones. El papel protector de la leche donada en los prematuros se podría explicar en parte por la concentración estable de HMOs que se encuentra en la leche madura y por la resistencia de los HMOs a la digestión (Daniels *et al.*, 2017; De Leoz *et al.*, 2012).

La concentración de *mio*-inositol en la leche donada no cambió como consecuencia de la pasteurización Holder, confirmando resultados de anteriores estudios (de Segura *et al.*, 2012). Este azúcar alcohol tiene una elevada demanda en los tejidos neonatales, como el músculo esquelético y la epidermis. También se encuentra en alta concentración de la sangre del neonato y, además, es el principal metabolito presente en el cerebro neonatal (Jóźwik *et al.*, 2013). Desafortunadamente, la concentración de *mio*-inositol en la leche disminuye exponencialmente pasados los primeros cuatro días después del parto, estabilizándose después a ~243 mg/L (1.350  $\mu$ M) (de Segura *et al.*, 2012; Jóźwik *et al.*, 2013; Moles *et al.*, 2015). Por lo tanto, la concentración de *mio*-inositol en leche donada, cuya composición se corresponde con la de la leche madura, probablemente sea muy escasa para cubrir las necesidades de los prematuros.

La principal fracción lipídica encontrada en la leche donada es la de los TAG, representando ~97% de los lípidos totales. Los cambios en los TAG y los DAG durante el tratamiento HTST a 70°C pueden reflejar la hidrólisis parcial de los TAG, tal como han sugerido otros autores (Lepri *et al.*, 1997). Sin embargo, la congelación y descongelación de la leche donada causan una mayor hidrólisis de los TAG que la pasteurización (Wardell *et al.*, 1981).

El impacto de la pasteurización Holder en el perfil de AGs se ha estudiado en numerosas ocasiones, con resultados unánimes concluyendo que el contenido de AGs no se modifica después este tratamiento (Borgo *et al.*, 2015; Delgado *et al.*, 2014; Fidler *et al.*, 2001; Henderson *et al.*, 1998; Romeu-Nadal *et al.*, 2008; Valentine *et al.*, 2010). En cambio, otros han encontrado ligeros cambios en la proporción de AGs saturados totales (aumento) y AGs monoinsaturados (disminución) (Ewaschuck *et al.*, 2011), o una pequeña disminución en los ácidos linoleico y  $\alpha$ -linolénico (Wardell *et al.*, 1981). En este estudio, al examinar los AGs individuales, se observó que la concentración de la mayoría de los AGs de cadena larga (SFAs, MUFAs y PUFAs) era mayor en leche donada tratada térmicamente en comparación con la leche sin tratar.

Se sabe que los tratamientos térmicos ( $>70^{\circ}\text{C}$ ) desnaturalizan las proteínas de la membrana del glóbulo graso de la leche, reduciendo su estabilidad y, junto con la congelación-descongelación, favorecen la lipólisis de la leche y la liberación de lípidos en la fase acuosa. El aumento de AGs después del tratamiento térmico de la leche donada debe considerarse deseable porque los AGs libres son fácilmente absorbidos en el intestino y, por tanto, mejora el valor nutricional de la leche donada (de Oliveira, 2017; Lepri *et al.*, 1997). Esto es relevante ya que los RN prematuros tienen menor nivel tanto de las actividades de la lipasa pancreática y lingual como del contenido de sales biliares. Además, la lipasa activada por sales biliares de la leche se inactiva a temperaturas relativamente bajas ( $45\text{-}55^{\circ}\text{C}$ ) (Tudehope, 2013; Wardell *et al.*, 1981). La lipasa activada por sales biliares de la leche materna aumenta la absorción de grasa en los prematuros porque mejora la lipólisis. Pero, desafortunadamente, la actividad de esta lipasa de la leche se pierde completamente después de la pasteurización Holder (Baro *et al.*, 2011; Williamson, 1978). En la leche sometida a tratamiento HTST se retuvo una mayor proporción de la actividad de la lipasa activada por sales biliares, en comparación con la pasteurizada por el método Holder. Sin embargo, la diferencia no fue estadísticamente significativa, de acuerdo con los datos obtenidos por otros autores (Giribaldi *et al.*, 2016).

De entre todos los AGs de la leche humana, los de mayor interés son los PUFAs, y en concreto el ARA y el DHA, debido a su alta acumulación en el cerebro infantil y su impacto en la función de las membranas, la síntesis de eicosanoides y docosaesanooides y, por consiguiente, en la regulación de procesos fisiológicos y el desarrollo y la función de tejidos neuronales e inmunes (Koletzko, 2016). Sin embargo, el contenido de DHA en la leche humana no está regulado por la glándula mamaria, sino que depende de su concentración en los lípidos plasmáticos de la madre que depende, a su vez, de su dieta. Por lo tanto, se recomienda que las mujeres que amamantan deberían ingerir más de 200 mg de DHA diarios para lograr que el contenido de DHA en la leche sea de, al menos, el 0,3% de los AGs (Koletzko *et al.*, 2014). En consecuencia, el contenido de DHA en la leche materna varía significativamente entre individuos. La mezcla de leche de distintas donantes limitaría las variaciones entre los distintos lotes a lo largo del tiempo.

Por el contrario, la mayor parte del ARA presente en la leche proviene de las reservas maternas de ARA y no de la dieta (Del Prado *et al.*, 2001). Además, como ni la pasteurización Holder ni la HTST afectan negativamente al contenido de DHA y ARA en la leche humana, probablemente la leche pasteurizada contenga una cantidad consistente de PUFAs de cadena larga (Baack, 2012). Dada toda la información disponible sobre la importancia de estos PUFAs en los neonatos, se debería evaluar con más detalle la suplementación adecuada de la leche con una proporción equilibrada de DHA/ARA para mejorar la salud general y el neurodesarrollo de esta población en riesgo.

En esta Tesis Doctoral también se exploró el efecto de los tratamientos térmicos sobre varias vitaminas seleccionadas. Las vitaminas son micronutrientes esenciales para el crecimiento y el desarrollo. Algunas son necesarias para lograr un crecimiento correcto, en cuanto a peso y longitud (ácido fólico, vitamina A, piridoxina), otras son importantes para el desarrollo y crecimiento del cerebro (folato, vitamina A), mientras que otras son esenciales para la mineralización del hueso (vitamina D) (Martin *et al.*, 2016). La pasteurización Holder y los tratamientos HTST no tienen un efecto sustancial en la concentración de las vitaminas del grupo B (tiamina, riboflavina, nicotinamida y piridoxal) ni en varias vitaminas liposolubles (A, E, incluyendo  $\alpha$ - y  $\gamma$ -tocoferol, D<sub>3</sub> y 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub>) en la leche donada. Sin embargo, los RN prematuros, que tienen muy altos requerimientos de nutrientes pero muy limitadas reservas de los mismos, suelen recibir fortificantes que contienen proteínas y una mezcla compleja de vitaminas y minerales o suplementos vitamínicos específicos (Underwood, 2016). La suplementación con micronutrientes puede favorecer el crecimiento óptimo en RN extremadamente prematuros, como se ha demostrado para el folato (Sjöström *et al.*, 2016). Pero esta suplementación se debe optimizar individualmente y controlar cuidadosamente ya que un exceso puede estar asociado con toxicidad.

La vitamina D es especialmente preocupante en los RN prematuros porque la leche humana es una fuente inadecuada de esta vitamina, así como de calcio y fósforo. La vitamina D es un modulador clave del metabolismo del calcio y de los huesos y también está implicada en el sistema inmunológico innato y en las funciones neuromusculares (Holick, 2007). Por lo tanto, los neonatos prematuros están en riesgo de enfermedad ósea metabólica debido a la ingesta inadecuada de vitamina D, calcio y fósforo. De hecho, esta condición está presente en ~50% de los RN de muy bajo peso al nacer y ~25% de los de muy bajo peso (Bathia, 2013). Actualmente no existe consenso en cuanto a la dosis más adecuada de los suplementos de vitamina D para los prematuros, hay incertidumbre sobre las consecuencias de las diferentes dosis recomendadas (de 200 a 1000 UI/día) y, además, falta información sobre la seguridad en RN de muy bajo peso (Kołodziejczyk *et al.*, 2015; Natarajan *et al.*, 2014). La hipervitaminosis D puede ocurrir como consecuencia de la fortificación excesiva de la leche y, aunque raros, se han descrito algunos casos de intoxicación (Nako *et al.*, 2004; Vogiatzi *et al.*, 2014).

Del mismo modo, los prematuros tienen al nacer un bajo nivel corporal y en suero de tocoferol. Esto está relacionado en parte con sus bajas reservas de grasa corporal y, por ello, requieren un mayor suministro de antioxidantes al estar expuestos a un mayor estrés oxidativo debido a las infecciones, la ventilación mecánica y la nutrición intravenosa (Lima *et al.*, 2014). Sin embargo, no hay consenso sobre la ingesta adecuada de vitamina E. La dosis diaria recomendada de vitamina E se ha establecido en 2,8 mg/kg diarios (Greene *et al.*, 1988). En prematuros de muy bajo peso y niños pretérmino, la suplementación con vitamina E reduce el riesgo de

retinopatía y hemorragia intracraneal, respectivamente. Pero, en ambos grupos, dosis excesivas de esta vitamina pueden aumentar el riesgo de sepsis (Brion y Raghuveer, 2003). Por lo tanto, éste es otro ejemplo de la compleja relación entre la ingesta de nutrientes y la función, que no siempre sigue una simple relación lineal sino que, a menudo, es una curva en forma de U indicando que para muchos nutrientes tanto una deficiencia como un exceso pueden tener efectos patológicos. Además, esta relación podría ser más compleja si se consideran la genómica y las interacciones con otros nutrientes (Binns y Low, 2014).

Es chocante que los requerimientos de micronutrientes en los prematuros no estén perfectamente establecidos. La falta de técnicas apropiadas, que no impliquen un procesamiento laborioso de las muestras, ni mucho tiempo para su análisis y/o un gran volumen de muestra, pueden explicar, al menos en parte, los escasos datos sobre los requerimientos de estos compuestos. Para las vitaminas hidrosolubles, podría tener interés la técnica UPLC-MS/MS desarrollada recientemente porque permite detectar simultáneamente varias vitaminas de esta clase en un corto período de tiempo (Hampel *et al.*, 2012).





## IX.7. ANÁLISIS GLOBAL DE LOS CAMBIOS EXPERIMENTADOS POR LA LECHE DONADA SOMETIDA A PASTEURIZACIÓN HOLDER Y TRATAMIENTOS HTST

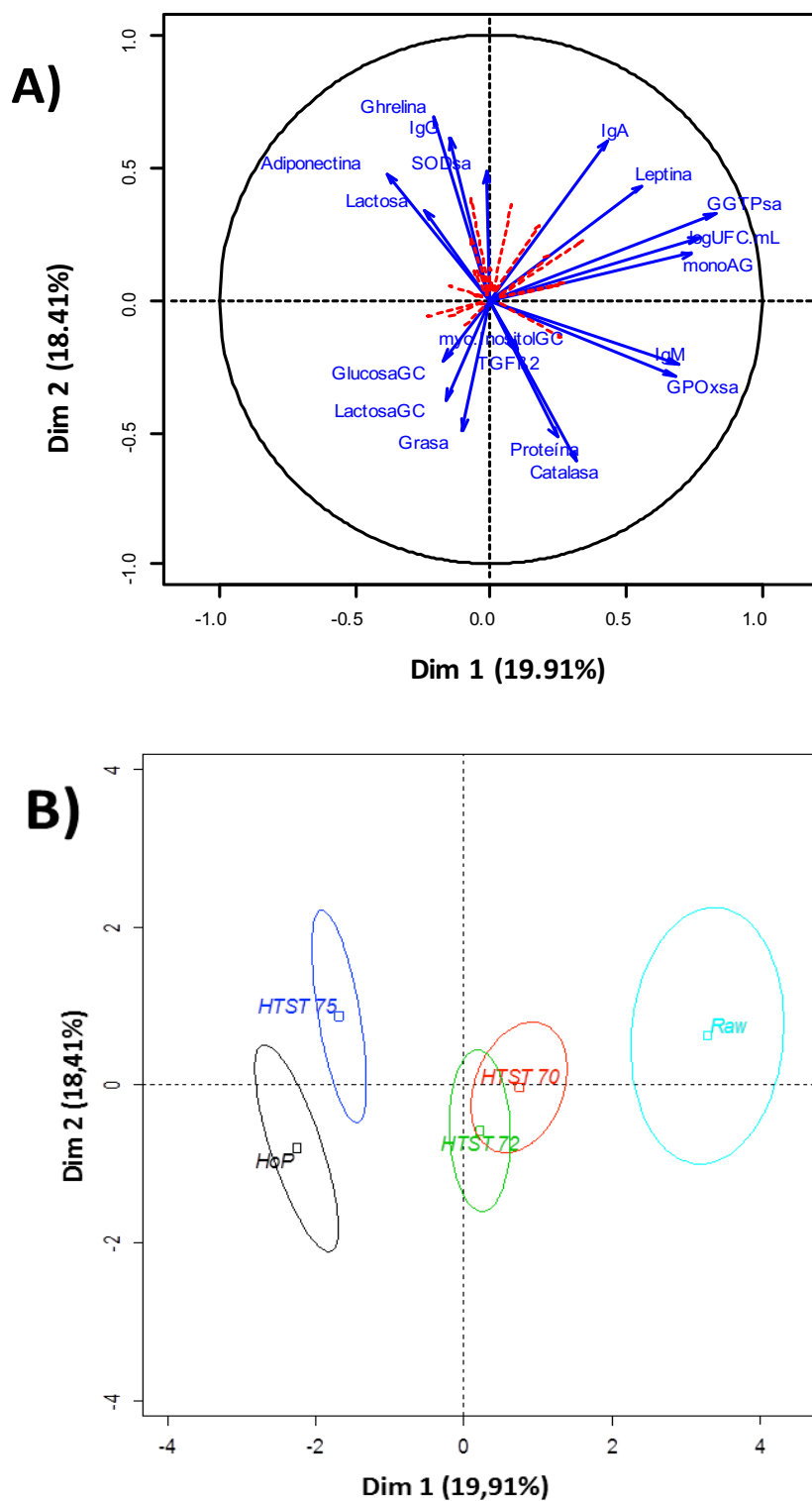
Como recopilación de los resultados obtenidos al analizar el efecto del tratamiento HTST en distintas características de la leche donada y para comparar este tratamiento con la pasteurización Holder, se ha realizado un análisis multivariado exploratorio en 10 lotes de muestras sometidas a tratamiento HTST: 3 lotes de 70°C, 4 lotes de 72°C y 3 lotes de 75°C. Estos análisis se han realizado con el software estadístico R, version 3.3.2 (R-project, <http://www.r-project.org>).

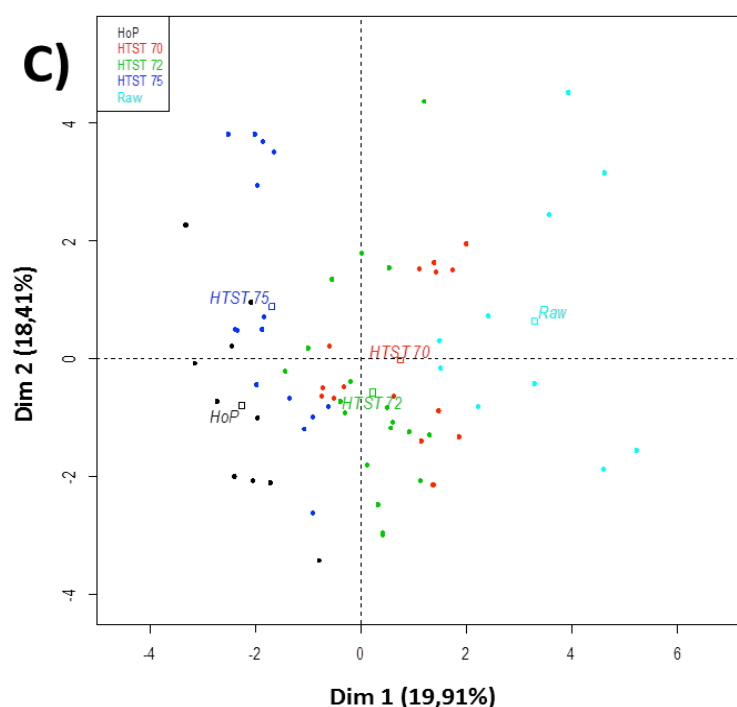
En el análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) se han incluido los resultados obtenidos en 40 de las variables estudiadas. Se ha empleado un método de reducción de variables ( $\cos^2 > 0,2$ ), que ha permitido identificar aquellos parámetros que contribuyen con un mayor peso en la separación de los distintos tratamientos (paquete *FactoMineR*, de R) (Figura 17).

En el resumen del análisis se observan 6 componentes con un *eigen* valor  $>1$ , que explican un 75% de la variabilidad observada. De los parámetros incluidos en el análisis, el recuento final de bacterias (log ufc/mL), la concentración de IgM, la actividad de la GGTP (GGTPsa), la actividad de la glutatión peroxidasa (GPOxsa) y la concentración de MUFAs (monoAG) presentan una notable contribución ( $>10$ ) en el componente 1 (*Dimensión 1*) que explica un 19,91% de la variabilidad del conjunto de datos. Por su parte, las concentraciones de IgA, IgG y ghrelina y la actividad de la catalasa también presentan una contribución similar ( $>10$ ) en el componente 2 (*Dimensión 2*) que explica un 18,40% de la variabilidad del conjunto de datos. Además, la concentración de TGF- $\beta_2$ , glucosa (GlucosaGC), *mio*-inositol (*myo*-InositolGC) y lactosa (LactosaGC) (estos tres últimos compuestos determinados por cromatografía de gases) presentan igualmente una contribución significativa ( $>10$ ) en el componente 3 (*Dimensión 3*) que explica un 13,15% de la variabilidad del conjunto de datos.

Globalmente, este conjunto de variables seleccionadas supone una variabilidad acumulada de más del 50% del total. Además, las dimensiones 1, 3 y 4 tienen una correlación significativa con el tipo de tratamiento, siendo el valor de  $R^2$  para estas dimensiones de 0,808, 0,309 y 0,227, respectivamente ( $P < 0,001$ ). En la Figura 17 se muestran los resultados del análisis: el mapa de las variables (A), los centroides de cada uno de los tratamientos, con una representación de las elipses correspondientes para una significación del 95% (B) y la representación de cada uno de los tratamientos incluidos en el análisis, con los correspondientes centroides sobre el mapa de las dimensiones 1 y 2 (C). Como se observa en estas figuras, la separación entre los distintos tratamientos viene dirigida principalmente por aquellas variables que contribuyen a la primera dimensión (el recuento final de bacterias, la concentración de

IgM, la actividad de la GGTP, la actividad de la glutatión peroxidasa y la concentración de MAG), siendo los tratamientos que más se alejan de las características de la leche cruda, el método Holder y el tratamiento HTST a 75°C. Por otro lado, no hay una clara separación entre los tratamientos HTST a 70 y 72°C. (Figura 17B y C)





**Figura 17.** Análisis de componentes principales de 10 lotes de leche donada sometidos a distintos tratamientos térmicos: pasteurización Holder y tratamientos HTST (70, 72 y 75°C).

**A)** Mapa bidimensional que muestra las variables que contribuyen de forma significativa a la separación de los distintos tratamientos. Las variables con un  $\cos^2 > 0,2$  están representadas como flechas azules, mientras que las flechas rojas discontinuas representan las variables con una menor contribución. Variables: Adiponectina ( $\mu\text{g/L}$ ), Catalasa (U/L), GlucosaGC (glucosa determinada por GC; mg/L), Grasa (%), Ghrelina (ng/L), GGTPsa (% de inactivación de GGTP  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasa), GPOxa (glutathion-peroxidasa; U/L), IgA (mg/L), IgG (mg/L), IgM (mg/L), Lactosa (%), LactosaGC (lactosa determinada por GC, g/L), Leptina (ng/L), log UFC/mL (recuentos totales después del tratamiento térmico, log ufc/mL), monoAG (sumatorio del % de MAG), myo-InositolGC (*mio*-inositol determinado por GC, mg/L), Proteína (%), SODsa (% de inhibición de la superóxido dismutasa) y TGF $\beta$ 2 (ng/L).

**B)** Mapa bidimensional de centroides (cuadrados) y elipsoides obtenidos con una significación del 95%, correspondientes a los distintos tratamientos: Raw: leche cruda (azul claro), HoP: pasteurización Holder (negro), HTST 70°C (rojo), HTST 72°C (verde) y HTST 75°C (azul oscuro).

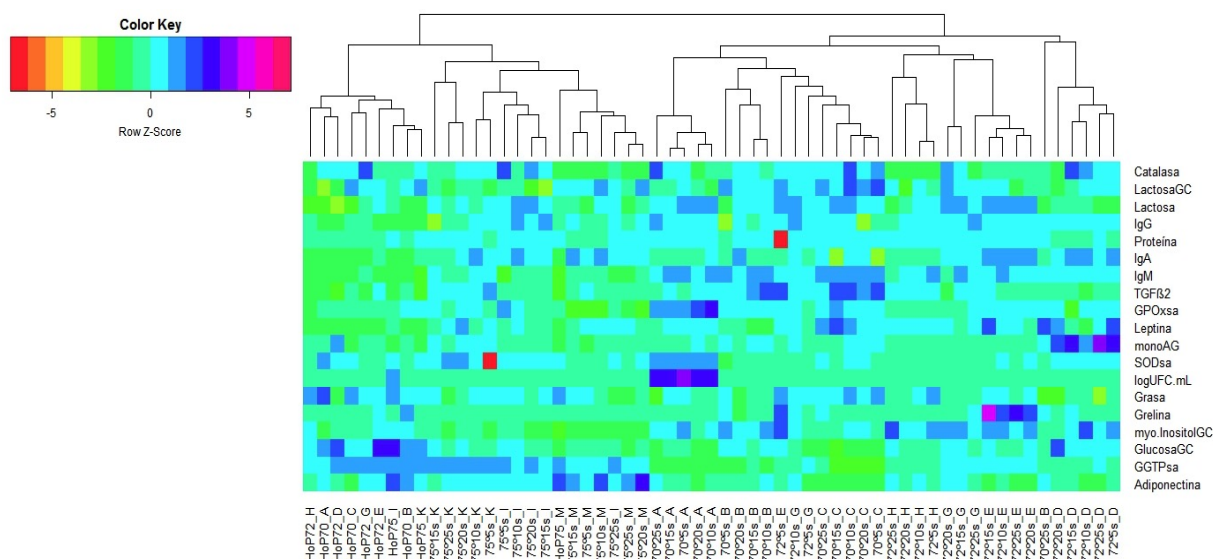
**C)** Mapa bidimensional de centroides (cuadrados) y muestras incluidas en el PCA (círculos) correspondientes a los distintos tratamientos: Raw: leche cruda (azul claro), HoP: pasteurización Holder (negro), HTST 70°C (rojo), HTST 72°C (verde) y HTST 75°C (azul oscuro).

GC: cromatografía de gases, GGTP:  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasa, MAG: monoacilglicéridos, TGF- $\beta$ 2: factor de crecimiento transformante  $\beta$ 2.

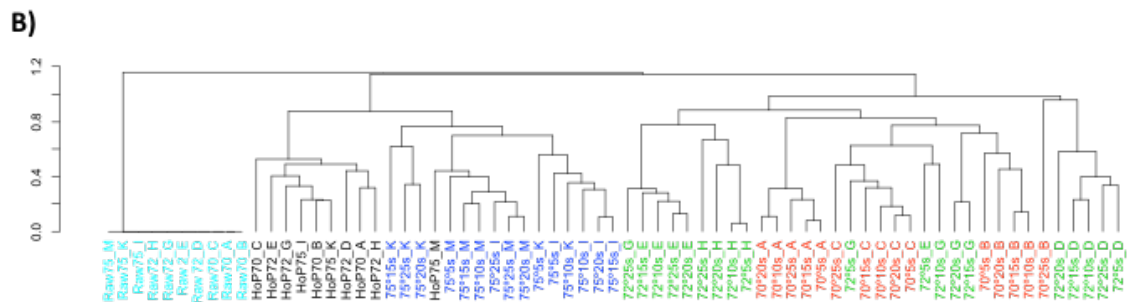
Además, con las 20 variables que presentaron un  $\cos^2 > 0,2$  en el PCA, se ha calculado la tasa de retención (% cantidad retenida/cantidad presente en el lote crudo correspondiente) y se ha realizado un agrupamiento jerárquico (*hierarchical clustering*). Para ello se ha calculado el coeficiente de Spearman para cada uno de los tratamientos realizados en los lotes analizados y se ha empleado “average”, como método de aglomeración (paquete *dendextend*, de R).

Una vez obtenido el dendrograma, se ha representado un *heat map* en el que de manera global se aprecia cómo la proporción de compuestos (nutrientes o compuestos con actividad biológica) retenidos es menor en las muestras sometidas al método Holder y HTST a 75°C (Figura 18). A una distancia de anidamiento de 0,9 se pueden diferenciar seis grupos (*clusters*) distintos. El primero (*cluster* I) contiene el 90% de las muestras tratadas por el método Holder. En la misma rama, el *cluster* II agrupa todos los tratamientos HTST a 75°C. Los tratamientos HTST a 70°C están agrupados todos en el *cluster* III, excepto un lote tratado a 70°C y 25 segundos que forma un grupo con una única hoja (*cluster* V) y a una distancia de separación mayor. Finalmente los tratamientos a 72°C aparecen agrupados en los *clusters* IV y VI, aunque tres de ellos están formando parte del *cluster* III; dos de los cuales son tratamientos a 5 segundos y uno a 10 segundos. En la Figura 19A se ha representado el dendrograma con el que se ha representado el *heat map*, mientras que la Figura 19B muestra como se agruparían las muestras si incluyéramos los lotes sin procesar.

Considerando globalmente los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral y teniendo en cuenta los análisis multivariados realizados, el procesamiento HTST a 72°C durante 15 segundos de la leche donada que logra los objetivos de seguridad microbiológica necesarios para distribuir esta leche a RN prematuros y/o enfermos, conserva la actividad biológica, o un elevado porcentaje de la misma, de un gran número de compuestos que se relacionan con los beneficios clínicos de la leche humana.



**Figura 18.** *Heat map* de la tasa de retención de aquellas variables que contribuyen de forma significativa al PCA en 10 lotes de leche donada sometida a distintos tratamientos térmicos (pasteurización Holder y tratamientos HTST a 70, 72 y 75°C). Se ha calculado el z-score de las tasas de retención para cada una de las variables, como muestra la leyenda, que se ha empleado en el cálculo del coeficiente de correlación de Spearman y, posteriormente, se han agrupado por el método de aglomeración “average”. Cada fila representa las tasas de retención para cada una de las variables mostradas en el eje vertical (ver leyenda en Figura 17A). Las columnas representan cada uno de los tratamientos a los que se han sometido los 10 lotes de muestra. El agrupamiento jerárquico de los 59 tratamientos empleados en este análisis se muestra en el dendrograma que aparece en la parte superior de la figura.



## **IX.8. APLICABILIDAD PRÁCTICA**

A la vista de los resultados obtenidos tras la validación del cuestionario del banco de leche en lo que respecta al consumo de drogas ilegales, legales y cafeína por parte de las posibles candidatas a donantes, este cuestionario debería ser ampliado para incluir el hábito de consumo de tabaco de otros miembros de la unidad familiar e información más detallada sobre el tipo y volumen de productos con cafeína consumidos, su método de preparación y el momento de su consumo.

Dado que en uno de los estudios incluidos en esta tesis se ha establecido la equivalencia de la acidez en grados Dornic, técnica ampliamente utilizada en muchos bancos de leche como control de calidad de la leche cruda, con su valor correspondiente en pH, se podría emplear la medida del pH en los bancos de leche ya que tiene la ventaja de que es un método más objetivo, no requiere reactivos y no destruye la muestra.

El pasteurizador HTST diseñado podría implantarse con seguridad en los bancos de leche permitiendo el tratamiento térmico de forma continua de grandes volúmenes de leche, lo cual ayudaría a resolver la limitación que actualmente provoca el uso de la pasteurización Holder como procedimiento fundamental para garantizar la seguridad microbiológica de la leche donada.

El pasteurizador HTST diseñado y validado podría implantarse en la rutina práctica del banco de leche ofreciendo una mayor calidad de la leche pasteurizada, ya que dicho tratamiento conserva, en comparación con el método Holder, mayor porcentaje de muchos de los compuestos bioactivos que se relacionan con beneficios clínicos en los niños que la reciben.

En el futuro sería deseable realizar un ensayo clínico con niños con un peso inferior de 1500 gramos para comprobar si la leche donada pasteurizada con un tratamiento HTST aporta mayores beneficios. El grupo experimental recibiría leche donada pasteurizada por el nuevo equipo HTST y el grupo control recibiría leche pasteurizada por el método Holder. Se evaluaría como principal variable clínica la tasa de infección nosocomial entre ambos grupos.





**X.**

**CONCLUSIONES**

---



Las conclusiones obtenidas a partir de los resultados de este trabajo de investigación son las siguientes:

**Primera.** El cuestionario que rellenan las potenciales donantes de leche sobre su estado de salud y estilo de vida permite descartar el posible uso de drogas ilícitas y tabaco pero tiene ciertas limitaciones en relación con la exposición involuntaria al humo del tabaco y con el consumo de bebidas con cafeína.

**Segunda.** Considerando la equivalencia entre pH y acidez Dornic, los bancos de leche humana podrían aceptar leche donada con un pH > 6,57 (equivalente a 8° Dornic).

**Tercera.** El equipo diseñado para la pasteurización HTST atendiendo a las necesidades específicas de un banco de leche humana permite procesar de una forma rápida, continua, controlada y reproducible distintos volúmenes de leche donada en función de las necesidades del banco.

**Cuarta.** La pasteurización HTST a 72°C y 15 segundos en el equipo diseñado en esta Tesis Doctoral destruye eficazmente las formas vegetativas de todos los microorganismos presentes en la leche cruda donada, pero no las formas esporuladas de *Bacillus* sp.

**Quinta.** La calidad de la leche donada pasteurizada (72°C, 15 segundos) en el equipo diseñado en esta Tesis Doctoral es superior a la leche pasteurizada por el método Holder ya que los porcentajes de retención de algunos compuestos con actividad biológica, como las inmunoglobulinas A, M y G, el factor de crecimiento transformante  $\beta_2$  (TGF- $\beta_2$ ) y la leptina, son significativamente superiores. Además, otros compuestos biológicamente activos, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), la adiponectina o la ghrelina, no sufren cambios con los tratamientos de pasteurización evaluados.

**Sexta.** El tratamiento (72°C, 15 segundos) de la leche donada en el equipo diseñado en esta Tesis Doctoral preserva su calidad nutritiva tanto en relación con los principales macronutrientes (grasa, lactosa y proteína), como con un gran número de micronutrientes relevantes (*mio*-inositol, ácidos grasos, vitaminas hidrosolubles y liposolubles).



## **XI.**

## **BIBLIOGRAFÍA**

---



- AAP** (American Academy of Pediatrics). Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics*. 2012; 129:600-3.
- Adlerberth I**, Lindberg E, Aberg N, Hesselmar B, Saalman R, et al. Reduced enterobacterial and increased staphylococcal colonization of the infantile bowel: an effect of hygienic lifestyle. *Pediatric Res*. 2006; 59:96–101.
- AEP** (Asociación Española de Pediatría). Manual de Lactancia Materna: De la teoría a la práctica. Editorial Médica Panamericana. 2004.
- Agarwal S**, Karmaus W, Davis S, Gangur V. Immune markers in breast milk and fetal and maternal body fluids: a systematic review of perinatal concentrations. *J Hum Lact*. 2011; 27:171-86.
- Agostoni C**, Braegger C, Decsi T, Kolacek S, Koletzko B, et al. Breast-feeding: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2009; 49:112–25.
- Ahrné S**, Lönnermark E, Wold AE, Åberg N, Hesselmar B, et al. Lactobacilli in the intestinal microbiota of Swedish infants. *Microb Infect*. 2005; 7:1256–62.
- Albenzio M**, Santillo A, Stolfi I, Manzoni P, Iliceto A, et al. Lactoferrin levels in human milk after preterm and term delivery. *Am J Perinatol*. 2016; 33:1085–9.
- Almutawif Y**, Hartmann B, Lloyd M, Erber W, Geddes D. A retrospective audit of bacterial culture results of donated human milk in Perth, Western Australia. *Early Hum Dev*. 2017; 105:1–6.
- Aprigio J**. Breastfeeding. *Rio de Janeiro: Editora Fiocruz*. 2001; pp:81–101.
- Arnold L**, Erickson M. The early history of milk banking in the USA. *J Hum Lact*. 1988; 4:112-3.
- Arnold LD**. How North American donor milk banks operate; results of a survey. *J Hum Lact*. 1997; 13:159–62.
- Arnold LD**. Human milk storage and preservation in the early 1900s. *J Hum Lact*. 1992; 9:121–3.
- Arnold LD**. The cost-effectiveness of using banked donor milk in the neonatal intensive care unit: prevention of necrotizing enterocolitis. *J Hum Lact*. 2002; 18:172–7.
- Arnold LD**. The ethics of donor human milk banking. *Breastfeed Med*. 2006; 1:3–13.
- Arnold LD**. The lactariums of France. *J Hum Lact*. 1994; 19:125–6.
- Arnold LDW**. Human milk in the NICU. Policy into practice. Jones and Bartlett Publishers, LLC; Sudbury, Massachusetts, USA. 2010.
- Arnold M**, Adamkin D, Radmacher P. Improving fortification with weekly analysis of human milk for VLBW infants. *J Perinatol*. 2017; 37:194–6.
- Arslanoglu S**, Bertino E, Tonetto P, et al. Guidelines for the establishment and operation of a donor human milk bank. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2010; 23:1–20.
- Arslanoglu S**, Moro GE, Bellù R, Turoli D, De Nisi G, et al. Presence of human milk bank is associated with elevated rate of exclusive breastfeeding in VLBW



- infants. *J Perinat Med*. 2013; 41:129–31.
- Arslanoglu S.** IV. Individualized fortification of human milk: adjustable fortification. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2015; 61:S4–5.
- Asquith MT.** Chairperson's forum. HMBANA Newsletter .1988; 3:1.
- Atkinson SA,** Bryan MH, Anderson GH. Human milk: difference in nitrogen concentration in milk from mothers of term and premature infants. *J Pediatr*. 1978; 93:67–9.
- Baack ML,** Norris AW, Yao J, Colaizy T. Long-chain polyunsaturated fatty acid levels in US donor human milk: meeting the needs of premature infants? *J Perinatol*. 2012; 32:598–603.
- Bailey DN,** Weibert RT, Naylor AJ, Shaw RF. A study of salicylate and caffeine excretion in the breast milk of two nursing mothers. *J Anal Toxicol*. 1982; 6:64–8.
- Ballard O,** Morrow AL. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatr Clin North Am*. 2013; 60:49–74.
- Balmer S.** Donor milk banking and guidelines in Britain. *J Hum Lact*. 1995; 229–31.
- Baro C,** Giribaldi M, Arslanoglu S, Giuffrida MG, Dellavalle G, et al. Effect of two pasteurization methods on the protein content of human milk. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2011; 3:818–29.
- Barrenetxe J,** Villaro AC, Guembe L, Pascual I, Muñoz-Navas M, et al. Distribution of the long leptin receptor isoform in brush border, basolateral membrane, and cytoplasm of enterocytes. *Gut*. 2002; 50:797–802.
- Bathia J.** Leche humana y el neonato prematuro. *Ann Nutr Metab*. 2013; 62:8–14.
- Becker GE,** Smith HA, Cooney F. Methods of milk expression for lactating women. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015; 27:CD006170.
- Berlin CM Jr,** Denson HM, Daniel CH, Ward RM. Disposition of dietary caffeine in milk, saliva, and plasma of lactating women. *Pediatrics*. 1984; 73:59–63.
- Bertino E,** Coppa GV, Giuliani F, Coscia A, Gabrielli O, et al. Effects of Holder pasteurization on human milk oligosaccharides. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2008; 21:381–5.
- Bertotto A,** Gerli R, Castellucci G, Scalise F, Vaccaro R. Human milk lymphocytes bearing the gamma/delta T-cell receptor are mostly delta TCS1-positive cells. *Immunology*. 1991; 74:360–1.
- Bharwani SK,** Green BF, Pezzullo JC, Bharwani SS, Bharwani SS, Dhanireddy R. Systematic review and meta-analysis of human milk intake and retinopathy of prematurity: a significant update. *J Perinatol*. 2016; 36:913–20.
- Bielicki J,** Huch R, von Mandach U. Time-course of leptin levels in term and preterm human milk. *Eur J Endocrinol*. 2004; 151:271–6.
- Binns C,** Lee M, Low WY. The long-term public health benefits of breastfeeding. *Asia Pac J Public Health*. 2016; 28:7–14.
- Binns C,** Low WY. Nutrition in the 21st century: riding the U-shaped wave. *Asia-Pac J Public Health/Asia-Pac*

- Acad Consort Public Health*. 2014; 26:444–6.
- Bjelakovic L**, Kocic G, Bjelakovic B, Zivkovic N, Stojanović D, et al. Alkaline phosphatase activity in human colostrum as a valuable predictive biomarker for lactational mastitis in nursing mothers. *Biomark Med*. 2012; 6:553–8.
- Blanchard J**, Weber CW, Shearer LE. HPLC analysis of methylxanthines in human breast milk. *J Chromatogr Sci*. 1990; 28:640–2.
- Bode L**. Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. *Glycobiology* 2012; 22:1147–62.
- Bonnet M**, Delavaud C., Laud K., Gourdou I., Leroux C, et al. Mammary leptin synthesis, milk leptin and their putative physiological roles. *Reprod Nutr Dev*. 2002; 42:399–413.
- Boo NY**, Nordiah AJ, Alfizah H, Nor-Rohaini AH, Lim VK. Contamination of breast milk obtained by manual expression and breast pumps in mothers of very low birthweight infants. *J Hosp Infect*. 2001; 49:274–81.
- Borgo LA**, Cohelho Araujo WM, Conceição MH, Sabioni Resck I, Mendonça MA. Are fat acids of human milk impacted by pasteurization and freezing? *Nutr Hosp*. 2015; 31:1386–93.
- Bourges D**, Meurens F, Berri M, Chevaleyre C, Zanello G, et al. New insights into the dual recruitment of IgA+ B cells in the developing mammary gland. *Mol Immunol*. 2008; 45:3354–62.
- Bourlieu C**, Michalski MC. Structure-function relationship of the milk fat globule. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2015; 18: 118–27.
- Boutibonnes P**, Giard JC, Hartke A, Thammavongs B, Auffray Y. Characterization of the heat shock response in *Enterococcus faecalis*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1993; 64:47–55.
- Boyce C**, Watson M, Lazidis G, Reeve S, Dods K, et al. Preterm human milk composition: a systematic literature review. *Br J Nutr*. 2016; 116:1033–45.
- Boyd CA**, Quigley MA, Brocklehurst P. Donor breast milk versus infant formula for preterm infants: systematic review and meta-analysis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2007; 92:F169–75.
- Braga LP**, Palhares DB. Effect of evaporation and pasteurization in the biochemical and immunological composition of human milk. *J Pediatr (Rio J)*. 2007; 83:59–63.
- Brahm P**, Valdés V. The benefits of breastfeeding and associated risks of replacement with baby formulas. *Rev Chil Pediatr*. 2017; 88:7–14.
- Brandtzaeg P**, Johansen F-E. IgA and intestinal homeostasis. In: Kaetzel CS, editor. Mucosal immune defense: immunoglobulin A. *New York: Springer Science + Business Media, LLC*; 2007. p. 221–68.
- Brandtzaeg P**. Mucosal immunity: integration between mother and the breast-fed infant. *Vaccine*. 2003; 21:3382–8.
- Brandtzaeg P**. The mucosal immune system and its integration with the mammary glands. *J Pediatr*. 2010; 156:S8–15.
- Bravi F**, Wiens F, Decarli A, Dal Pont A, Agostoni C, Ferraroni M. Impact of maternal nutrition on

- breast-milk composition: a systematic review. *Am J Clin Nutr.* 2016; 104:646–62.
- Brennan AM**, Murphy BP, Kiely ME. Optimising preterm nutrition: present and future. *Proc Nutr Soc.* 2016; 75:154–61.
- Brion LP**, Bell EF, Raghuvver TS. Vitamin E supplementation for prevention of morbidity and mortality in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2003; 4:CD003665.
- Brown JV**, Embleton ND, Harding JE, McGuire W. Multi-nutrient fortification of human milk for preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016; 8:CD000343.
- Brown PD**, Wakefield L.M, Levinsoz AD, et al. Physicochemical activation of recombinant latent transforming growth factor- $\beta$ 's 1, 2, and 3. *Growth Factors* 1990; 3:35–43.
- Brown SL**, Bright RS, Dwyer DE, et al. Breast pump adverse events: reports to the Food and Drug Administration. *J Hum Lact.* 2005; 21:169–74.
- Bustos G**. Vía clínica para extracción, conservación y administración de leche materna a los recién nacidos hospitalizados en el Servicio de Neonatología del Hospital 12 de Octubre. 2009.
- Cabrera-Rubio R**, Collado MC, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E, et al. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *Am J Clin Nutr.* 2012; 96:544–51.
- Cacho NT**, Parker LA, Neu J. Necrotizing enterocolitis and human milk feeding: a systematic review. *Clin Perinatol.* 2017; 44:49–67.
- CAM**. Observatorio Regional de Riesgos Sanitarios y Plan de Calidad para el Sistema Nacional de Salud. Available at: [http://www.madrid.org/cs/Satellite?cid=1142547133808&language=es&pagename=PortalSalud%2FPag e%2FPTSA\\_pintarContenidoFinal&vest=1162209989406](http://www.madrid.org/cs/Satellite?cid=1142547133808&language=es&pagename=PortalSalud%2FPag e%2FPTSA_pintarContenidoFinal&vest=1162209989406).
- Castellote C**, Casillas R, Ramirez-Santana C, Pérez-Cano FJ, Castell M, et al. Premature delivery influences the immunological composition of colostrum and transitional and mature human milk. *J Nutr.* 2011; 14:1181–7.
- Castro-Gómez M**, Holgado F; Rodríguez-Alcalá L, Montero O, Fontecha J. Comprehensive study of the lipid classes of krill oil by fractionation and identification of triacylglycerols, diacylglycerols and phospholipid molecular species by using UPLC/QToF-MS. *Food Anal Methods.* 2015; 10:2568–80.
- Castro-Gómez MP**, Rodríguez-Alcalá LM, Calvo MV, Romero J, Mendiola JA, Ibañez E, Fontecha J. Total milk fat extraction and quantification of polar and neutral lipids of cow, goat, and ewe milk by using a pressurized liquid system and chromatographic techniques. *J Dairy Sci.* 2014b; 97:6719–28.
- Castro-Gómez P**, Fontecha J, Rodríguez-Alcalá LM. A high-performance direct transmethylation method for total fatty acids assessment in biological and foodstuff samples. *Talanta.* 2014; 128:518–23.

- Castro-Gómez P**, Montero O, Fontecha J. In-depth lipidomic analysis of molecular species of triacylglycerides, diacylglycerides, glycerophospholipids, and sphingolipids of buttermilk by GC-MS/FID, HPLC-ELSD, and UPLC-QToF-MS. *Int J Mol Sci*. 2017; 18:605.
- Castro-Gómez P**, Rodríguez-Alcalá LM, Monteiro KM, Ruiz ALTG, Carvalho JE, Fontecha J. Antiproliferative activity of buttermilk lipid fractions isolated using food grade and non-food grade solvents on human cancer cell lines. *Food Chem*. 2016; 212:695–702.
- Çatlı G**, Olgaç Dünder N, Dünder BN. Adipokines in breast milk: an update. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2014; 6:192–201.
- Cervia JS**, Ortolano GA, Canonica FP. Hospital tap water as a source of *Stenotrophomonas maltophilia* infection. *Clin Infect Dis*. 2008; 46:1485–7.
- Chan GJ**, Valsangkar B, Kajeepeta S, Boundy EO, Wall S. What is kangaroo mother care? Systematic review of the literature. *J Glob Health*. 2016; 6:010701.
- Chang JC**, Chen CH, Fang LJ, Tsai CR, Chang YC, et al. Influence of prolonged storage process, pasteurization, and heat treatment on biologically-active human milk proteins. *Pediatr Neonatol*. 2013; 54:360–6.
- Chang JY**, Li L. The disulfide structure of denatured epidermal growth factor: preparation of scrambled disulfide isomers. *J Protein Chem*. 2002; 2:203–13.
- Chantry CJ**, Israel-Ballard K, Moldoveanu Z, Pearson J, Coutoudis A, et al. Effect of flash-heat treatment on immunoglobulins in breastmilk. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2009; 51:264–7.
- Chantry CJ**, Wiedeman J, Buehring G, et al. Effect of flash-heat treatment on antimicrobial activity of breastmilk. *Breastfeed Med*. 2011; 6:111–6.
- Charles BG**. Caffeine citrate treatment for extremely premature infants with apnea: population pharmacokinetics, absolute bioavailability, and implications for therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit*. 2008; 30:709–16.
- Chaudhri R**, Vlachos D, Kaza J, et al. A system for safe flash-heat pasteurization of human breast milk. Proceedings of the 5th Association for Computing Machinery Workshop on networked systems for developing regions. 2011.
- Chemat F**, Zill-e-Huma, Khan MK. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrason Sonochem*. 2011; 18:813–35.
- Chiavarini M**, Bragetti P, Sensini A, Cenci E, Castronari R, et al. Breastfeeding and transmission of cytomegalovirus to preterm infants. Case report and kinetic of CMV-DNA in breast milk. *Ital J Pediatr*. 2011; 37:6.
- Christen L**, Lai CT, Hartmann B, Hartmann PE, Geddes DT. Ultraviolet-C irradiation: a novel pasteurization method for donor human milk. *PLoS One*. 2013; 8:e681–20.

- Christen L**, Lai CT, Hartmann B, Hartmann PE, Geddes DT. The effect of UV-C pasteurization on bacteriostatic properties and immunological proteins of donor human milk. *PLoS One*. 2013; 8:e85867.
- Christen L**, Lai CT, Hartmann PE. Ultrasonication and the quality of human milk: variation of power and time of exposure. *J Dairy Res*. 2012; 79:361–6.
- Chilleruelo ML**, Calvo C. Fórmulas adaptadas para lactantes y modificaciones actuales de éstas. *An Pediatr Contin*. 2004; 2:325–38.
- Clark JA**, Lane RH, MacLennan NK, Holubec H, Dvorakova K, et al. Epidermal growth factor reduces intestinal apoptosis in an experimental model of necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005; 288:G755–62.
- Cleminson JS**, Zalewski SP, Embleton ND. Nutrition in the preterm infant: what's new? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2016; 19:220–5.
- Cohen R**, Babushkin F, Shimon Z, Cohen S, Litig E, et al. Water faucets as a source of *Pseudomonas aeruginosa* infection and colonization in neonatal and adult intensive care unit patients. *Am J Infect Control*. 2017; 45:206–9.
- Conde-Agudelo A**, Díaz-Rossello JL. Kangaroo mother care to reduce morbidity and mortality in low birthweight infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016; 23:CD002771.
- Considine KM**, Kelly AL, Fitzgerald GF, et al. High-pressure processing-effects on microbial food safety and food quality. *FEMS Microbiol Lett*. 2008; 281:1–9.
- Contador R**, Delgado FJ, García-Parra J, Garrido M, Ramírez R. Volatile profile of breast milk subjected to high-pressure processing or thermal treatment. *Food Chem*. 2015; 180:17–24.
- Contador R**, Delgado-Adámez J, Delgado FJ, Cava R, Ramírez R. Effect of thermal pasteurisation or high pressure processing on immunoglobulin and leukocyte contents of human milk. *Int Dairy J*. 2013; 32:1–5.
- Coppa GV**, Pierani P, Zampini L, et al. Oligosaccharides in human milk during different phases of lactation. *Acta Paediatr Suppl*. 1999; 88:89–94.
- Cordero-Moreno R**. An evocation of Pasteur. *Rev Soc Venez Hist Med*. 1992; 41:101–19.
- Corpeleijn WE**, de Waard M, Christmann V, van Goudoever JB, Jansen-van der Weide MC, et al. Effect of donor milk on severe infections and mortality in very low-birth-weight infants: the early nutrition study randomized clinical trial. *JAMA Pediatr*. 2016; 170:654–61.
- Corvaglia LI**. Nutritional requirements of extremely-low-birth-weight preterm infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2015; 61:S1–2.
- Coscia A**, Peila C, Bertino E, Coppa GV, Moro GE, et al. Effect of Holder pasteurisation on human milk glycosaminoglycans. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2015; 60:127–30.

- Cossey V**, Jeurissen A, Thelissen MJ, Vanhole C, Schuermans A. Expressed breast milk on a neonatal unit: a hazard analysis and critical control points approach. *Am J Infect Control*. 2011; 39:832–8.
- Cossey V**, Vanhole C, Eerdeken A, Rayyan M, Fieuws S, et al. Pasteurization of mother's own milk for preterm infants does not reduce the incidence of late-onset sepsis. *Neonatology*. 2013; 103:170–6.
- Coutsoudis I**, Adhikari M, Nair N, et al. Feasibility and safety of setting up a donor breastmilk bank in a neonatal prem unit in a resource limited setting: an observational, longitudinal cohort study. *BMC Public Health*. 2011; 11:356–62.
- Czank C**, Prime DK, Hartmann B, Simmer K, Hartmann PE. Retention of the immunological proteins of pasteurized human milk in relation to pasteurizer design and practice. *Pediatr Res*. 2009; 66:374–379.
- Czank C**, Simmer K, Hartmann PE. Simultaneous pasteurization and homogenization of human milk by combining heat and ultrasound: effect on milk quality. *J Dairy Res*. 2010; 77:183–9.
- Da Costa RS**, do Carmo MG, Saunders C, et al. Characterization of iron, copper and zinc levels in the colostrum of mothers of term and pre-term infants before and after pasteurization. *Int J Food Sci Nutr*. 2003; 54:111–7.
- Dahlström A**, Ebersjö C, Lundell B. Nicotine in breast milk influences heart rate variability in the infant. *Acta Paediatr*. 2008; 97:1075–9.
- Dani C**, Pratesi S, Barp J. Continuous milk feeding versus intermittent bolus feeding in preterm infants. *Early Hum Dev*. 2013; 89:S11–2.
- Daniels B**, Coutoudis A, Autran C, Amundson Mansen K, Israel-Ballard K, et al. The effect of simulated flash heating pasteurisation and holder pasteurisation on human milk oligosaccharides. *Paediatr Int Child Health*. 2017; 6:1–6.
- Daniels B**, Schmidt S, King T, Israel-Ballard K, Amundson Mansen K, et al. The effect of simulated flash-heat pasteurization on immune components of human milk. *Nutrients*. 2017; 22:9.
- De Halleux V**, Pielain C, Senterre T, Rigo J. Use of donor milk in the neonatal intensive care unit. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2017; 22:23–9.
- De Leoz MLA**, Gaerlan SC, Strum JS, et al. Lacto N Tetraose, fucosylation, and secretor status are highly variable in human milk oligosaccharides from women delivering preterm. *J Proteome Res*. 2012; 11:4662–72.
- De Rooy L**, Hamdallah H, Dyal SC. Extremely preterm infants receiving standard care receive very low levels of arachidonic and docosahexaenoic acids. *Clin Nutr*. 2016; 56:14:31277–8.
- De Segura AG**, Escuder D, Montilla A, Bustos G, Pallás C, et al. Heating-induced bacteriological and biochemical modifications in human donor milk after Holder pasteurisation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012; 54:197–203.
- De Silva A**, Jones PW, Spencer SA. Does human milk reduce infection

- rates in preterm infants? A systematic review. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2004; 89: F509–13.
- Decousser JW**, Ramarao N, Duport C, Dorval M, Bourgeois-Nicolaos N, et al. *Bacillus cereus* and severe intestinal infections in preterm neonates: putative role of pooled breast milk. *Am J Infect Control.* 2013; 41:918–21.
- Del Prado M**, Villalpando S, Elizondo A, Rodriguez M, Demmelmair H, Koletzko B: Contribution of dietary and newly formed arachidonic acid to human milk lipids in women eating a low-fat diet. *Am J Clin Nutr.* 2001; 74:242–7.
- Delgado FJ**, Cava R, Delgado J, Ramírez R. Tocopherols, fatty acids and cytokines content of Holder pasteurised and high-pressure processed human milk. *Dairy Sci Technol.* 2014; 94:145–56.
- Delgado FJ**, Contador R, Álvarez-Barrientos A, et al. Effect of high pressure thermal processing on some essential nutrients and immunological components present in breast milk. *Innovative Food Sci Emerg Technol.* 2013; 19:50–6.
- Demmelmair H**, Koletzko B. Variation of metabolite and hormone contents in human milk. *Clin Perinatol.* 2017; 44:151–64.
- Dempsey E**, Miletin J. Banked preterm versus banked term human milk to promote growth and development in very low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010; 16:CD007644.
- Dermyshe E**, Wang Y, Yan C, Hong W, Qiu G, et al. The "golden age" of probiotics: a systematic review and meta-analysis of randomized and observational studies in preterm infants. *Neonatal.* 2017; 112:9–23.
- Dewitte C**, Courdent P, Charlet C, Dumoulin D, Courcol R, et al. Contamination of human milk with aerobic flora: evaluation of losses for a human milk bank. *Arch Pediatr.* 2015; 22:461–7.
- Dhar J**, Fichtali J, Skura BJ, et al. Pasteurization efficiency of a HTST system for human milk. *J Food Sci.* 1996; 61:569–72.
- Dicky O**, Ehlinger V, Montjoux N, Gremmo-Féger G, Sizun J. Policy of feeding very preterm infants with their mother's own fresh expressed milk was associated with a reduced risk of bronchopulmonary dysplasia. *Acta Paediatr.* 2017; 27.
- Donalisio M**, Cagno V, Vallino M, et al. Inactivation of high-risk human papilloma-viruses by Holder pasteurization: implications for donor human milk banking. *J Perinat Med.* 2014; 42:1–8.
- Donovan SM**. Human milk: nutritional properties. In: *Nutrition in Pediatrics* 4. Basic Science, Clinical Applications. Duggan C, Watkins J, Walker WA (eds). BC Dekker Inc., Ontario, Canada. 2008; 341–353.
- Dvorak B**. Milk epidermal growth factor and gut protection. *J Pediatr.* 2010; 156:S31–5.
- Edmond K**, Bahl R. Optimal feeding of low-birth-weight infants. Geneva, Switzerland: World Health Organization. 2008.
- EFSA NDA Panel** (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and

- Allergies). Scientific Opinion on the essential composition of infant and follow-on formulae. *EFSA J*. 2014; 12:3760.
- Ehrenkranz RA.** Improving growth outcomes of VLBW infants: how to start? *Indian Pediatr*. 2010; 47:843–4.
- Ehrenthal DB,** Wu P, Trabulsi J. Differences in the protective effect of exclusive breastfeeding on child overweight and obesity by mother's race. *Matern Child Health J*. 2016; 20:1971–9.
- Eidelman AI.** Breastfeeding and the use of human milk: an analysis of the American Academy of Pediatrics, breastfeeding policy statement. *Breastfeeding Med*. 2012; 7:323–4.
- Elisia I,** Kitts DD. Quantification of hexanal as an index of lipid oxidation in human milk and association with antioxidant components. *J Clin Biochem Nutr*. 2011; 49:147–52.
- Emily E.** Stevens, Thelma E. Patrick, Rita Pickler. A history of infant feeding. *J Perinat Educ*. 2009; 18:32–9.
- Erickson T,** Gill G, Chan GM. The effects of acidification on human milk's cellular and nutritional content. *J Perinatol*. 2013; 33:371–3.
- Escuder-Vieco D,** Garcia-Algar Ó, Joya X, Marchei E, Pichini S, et al. breast milk and hair testing to detect illegal drugs, nicotine, and caffeine in donors to a human milk bank. *J Hum Lact*. 2016; 32:542–5.
- ESPGHAN** Committee on Nutrition, Arslanoglu S, Corpeleijn W, Moro G, Braegger C, et al. Donor human milk for preterm infants: current evidence and research directions. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2013; 57:535–42.
- Espinosa-Martos I,** Montilla A, de Segura AG, Escuder D, Bustos G, et al. Bacteriological, biochemical, and immunological modifications in human colostrum after Holder pasteurisation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2013; 56: 560–8.
- Evans TJ,** Ryley HC, Neale LM, Dodge JA, Lewarne VM. Effect of storage and heat on antimicrobial proteins in human milk. *Arch Dis Child* 1978; 53:239–41.
- Ewaschuk JB,** Unger S, Harvey S, O'Connor DL, Field CJ. Effect of pasteurization on immune components of milk: Implications for feeding preterm infants. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2011; 36:175–82.
- Ewaschuk JB,** Unger S, O'Connor DL, Stone D, Harvey S, et al. Effect of pasteurization on selected immune components of donated human breast milk. *J Perinatol*. 2011; 31:593–8.
- Ewer A,** Yu V. Gastric emptying in preterm infants: The effect of breast milk fortifier. *Acta Paediatrica*. 1996; 85:1112–5.
- Fanaro S.** Which is the ideal target for preterm growth? *Minerva Pediatr*. 2010; 62:77–82.
- Faria AM,** Weiner HL. Oral tolerance and TGF- $\beta$ -producing cells. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2006; 5:179–90.
- Fernández L,** Langa S, Martín V, Jiménez E, Martín R, et al. The microbiota of human milk in healthy women. *Cell Mol Biol*. 2013; 59:31–42.



- Fernández L**, Langa S, Martín V, Maldonado A, Jiménez E, et al. The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol Res.* 2013; 69:1-10.
- FHMBA**. (French Human Milk Bank Association). The good practice rules for the collection, preparation, qualification, treatment, storage, distribution and dispensing on medical prescription of human milk by the milk banks. 2008.
- Fidler N**, Sauerwald TU, Demmelmair H, Koletzko B. Fat content and fatty acid composition of fresh, pasteurized, or sterilized human milk. *Adv Exp Med Biol.* 2001; 501:485-95.
- Field CJ**. The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants. *J Nutr.* 2005; 135:1-4.
- Fields DA**, Camille R, Pavela G. A narrative review of the associations between six bioactive components in breast milk and infant. *Adiposity Obesity.* 2016; 24:1213-21.
- Fihman V**, Le Monnier A, Corvec S, Jauregui F, Tankovic J, et al. *Stenotrophomonas maltophilia* - the most worrisome treat among unusual non-fermentative gram-negative bacilli from hospitalized patients: a prospective multicenter study. *J Infection.* 2012; 64:391-8.
- Ford JE**, Law BA, Marshall VME, Reiter B. Influence of the heat treatment of human milk on some of its protective constituents. *J Pediatr.* 1977; 90:29-35.
- Forsyth S**, Gautier S, Salem N. The importance of dietary DHA and ARA in early life: a public health perspective. *Proc Nutr Soc.* 2017; 13:1-6.
- Fox PF**, Kelly AL. Indigenous enzymes in milk: overview and historical aspects-Part 1. *Int Dairy J.* 2006; 16:500-16.
- Friel JK**, Martin SM, Langdon M, et al. Milk from mothers of both premature and full-term infants provides better antioxidant protection than does infant formula. *Pediatr Res.* 2002; 51:612-8.
- Fundación** “La Gota de Leche”. <http://www.gotadeleche.org/>.
- Fusch G**, Rochow N, Choi A, Fusch S, Poeschl S, Ubah AO, Lee SY, Raja P, Fusch C. Rapid measurement of macronutrients in breast milk: How reliable are infrared milk analyzers? *Clin Nutr.* 2015; 34:465-76.
- Ganapathy V**, Hay JW, Kim JH. Costs of necrotizing enterocolitis and cost-effectiveness of exclusively human milk-based products in feeding extremely premature infants. *Breastfeed Med.* 2012; 7:29-37.
- García-Lara NR**, Escuder D, De la Cruz-Bértolo J, Lora-Pablos D, Velasco NU, et al. Effect of Holder pasteurization and frozen storage on macronutrients and energy content of breast milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2013; 57:377-82.
- Gavin A**, Ostovar K. Microbiological characterization of human milk. *J Food Protect.* 1977; 40:614-6.
- Gianni ML**, Sannino P, Bezze E, Comito C, Plevani L, et al. Does parental involvement affect the development of feeding skills in

- preterm infants? A prospective study. *Early Hum Dev.* 2016; 103:123–8.
- Gibbs JH**, Fisher C, Bhattacharya S, Goddard P, Baum, J.D. Drip breast milk: Its composition, collection and pasteurization. *Early Hum Dev.* 1977; 1:227–45.
- Gidrewicz DA**, Fenton TR. A systematic review and meta-analysis of the nutrient content of preterm and term breast milk. *BMC Pediatr.* 2014; 14:216.
- Giribaldi M**, Coscia A, Peila C, et al. Pasteurization of human milk by a benchtop High Temperature Short-Time device. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2016; 36:228–33.
- Giuliani F**, Prandi G, Coscia A, Cresi F, Di Nicola P et al. Donor human milk versus mother's own milk in preterm VLBWIs: a case control study. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2012; 26:19–24.
- Godambe S**, Shah PS, Shah V. Breast milk as a source of late onset neonatal sepsis. *Pediatr Infect Dis J.* 2005; 24:381–2.
- Goelz R**, Hihn E, Hamprecht K, Dietz K, Jahn G, et al. Effects of different CMV heat- inactivation-methods on growth factors in human breast milk. *Pediatr Res.* 2009; 65:458–61.
- Goes HC**, Torres AG, Donangelo CM, Trugo NM. Nutrient composition of banked human milk in Brazil and influence of processing on zinc distribution in milk fractions. *Nutrition.* 2002; 18:590–4.
- Goldblum RM**, Dill CW, Albrecht TB, et al. Rapid high-temperature treatment of human milk. *J Pediatr.* 1984; 104:380–5.
- Goldsmith SJ**, Dickson JS, Barnhart HM, Toledo RT, Eiten-Miller RR. IgA, IgG, IgM and lactoferrin contents of human milk during early lactation and the effect of processing and storage. *J. Food Protein.* 1983; 1:4–7.
- Goldsmith SJ**, Eitenmiller IRR, Toledo RT, Barnhart HM. Effects of processing and storage on the water-soluble vitamin content of human milk. *J. Food Sci.* 1983; 48:994–5.
- Gomes F**, Shaw N, Whitfield K, Koorts P, McConachy H, Hewavitharana A. Effect of pasteurisation on the concentrations of vitamin d compounds in donor breast milk. *Arch Dis Child.* 2016; 101:e2.
- Gómez M**, Moles L, Melgar A, Ureta N, Bustos G, et al. Early gut colonization of preterm infants: effect of enteral feeding tubes. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2016; 62:893–900.
- González HF**, Visentin S. Micronutrients and neurodevelopment: An update. *Arch Argent Pediatr.* 2016; 114:570–5.
- Good M**, Sodhi CP, Egan CE, Afrazi A, Jia H, et al. Breast milk protects against the development of necrotizing enterocolitis through inhibition of Toll Like Receptor 4 in the intestinal epithelium via activation of the epidermal growth factor receptor. *Mucosal Immunol.* 2015; 8:1166–79.
- Greene HL**, Hambidge M, Schanler R, Tsang RC. Guidelines for the use of vitamins, trace elements, calcium, magnesium, and phosphorus in infants and children receiving total parenteral nutrition:

- report of the Subcommittee on Pediatric Parenteral Nutrient Requirements from the Committee on Clinical Practice Issues of the American Society for Clinical Nutrition. *Am J Clin Nutr.* 1988; 48:1324–42.
- Greene Z**, O'Donnell CP, Walshe M. Oral stimulation for promoting oral feeding in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016; 20.
- Greer FR**, Marshall S, Cherry J, Suttie JW. Vitamin K status of lactating mothers, human milk, and breastfeeding infants. *Pediatrics* 1991; 88:751–6.
- Gregory KE**, Walker WA. Immunologic factors in human milk and disease prevention in the preterm infant. *Curr Pediatr Rep* 2013; 1: 222–8.
- Gridneva Z**, Kugananthan S, Hepworth AR, Tie WJ, Lai CT, et al. Effect of human milk appetite hormones, macronutrients, and infant characteristics on gastric emptying and breastfeeding patterns of term fully breastfed infants. *Nutrients.* 2016; 9:E15.
- Grosvenor CE**, Picciano MF, Baumrucker CR. Hormones and growth factors in milk. *Endocr Rev.* 1993; 14:710–28.
- Grøvslien AH**, Grønn M. Donor milk banking and breastfeeding in Norway. *J Hum Lact.* 2009; 25:206–10.
- Gutierre D**, de Almeida, JAG. Human milk banks in Brazil. *J Hum Lact.* 1998; 14:333–5.
- Haiden N**, Ziegler EE. Human milk banking. *Ann Nutr Metab.* 2016; 69:8–15.
- Hamilton Spence E**, Huff M, Shattuck K, Vickers A, Yun N, et al. Ebola virus and Marburg virus in human milk are inactivated by Holder pasteurization. *J Hum Lact.* 2017; (Ahead of print). doi: 10.1177/0890334416685564.
- Hamosh M**, Ellis LA, Pollock DR, et al. Breastfeeding and the working mother: effect of time and temperature of short-term storage on proteolysis, lipolysis, and bacterial growth in milk. *Pediatrics.* 1996; 97:492–8.
- Hamosh M**. Bioactive factors in human milk. *Pediatr Clin North Am.* 2001; 48:69–86.
- Hampel D**, Shahab-Ferdows S, Domek JM, Siddiqua T, Raqib R, et al. Competitive chemiluminescent enzyme immunoassay for vitamin B<sub>12</sub> analysis in human milk. *Food Chem.* 2014; 153:60–5.
- Hampel D**, York ER, Allen LH. Ultra-performance liquid chromatography tandem mass-spectrometry (UPLC-MS/MS) for the rapid, simultaneous analysis of thiamin, riboflavin, flavin adenine dinucleotide, nicotinamide and pyridoxal in human milk. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2012; 903:7–13.
- Hamprecht K**, Maschmann J, Müller D, Dietz K, Besenthal I, et al. Cytomegalovirus (CMV) inactivation in breast milk: Reassessment of pasteurization and freeze-thawing. *Pediatr Res.* 2004; 56:529–35.
- Hanson LA**. Comparative immunological studies of the immune globulins of human milk and of blood serum. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1961; 18:241–67.

- Hartmann BT.** Ensuring safety in donor human milk banking in neonatal intensive care. *Clin Perinatol.* 2017; 44:131–49.
- Haschke F,** Haiden N, Thakkar SK. Nutritive and bioactive proteins in breastmilk. *Ann Nutr Metab.* 2016; 69:17–26.
- Hasselbalch H,** Engelmann MD, Ersboll AK, Jeppesen DL, Fleischer-Michaelsen K. Breastfeeding influence thymic size in late infancy. *Eur J Pediatrics* 1996; 158:964–7.
- Hay WW,** Thureen P. Protein for preterm infants: how much is needed? How much is enough? How much is too much? *Pediatr Neonatol.* 2010; 51:198–207.
- Hay WW Jr,** Hendrickson KC. Preterm formula use in the preterm very low birth weight infant. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2017; 22:15–22.
- Healy DB,** Brennan AM, O'Donovan R, Daly V, Doolan A, et al. Structured promotion of breastmilk expression is associated with shortened hospitalization for very preterm infants. *Acta Paediatr.* 2016; 105:e252–6.
- Heikkilä MP,** Saris PEJ. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *J Appl Microbiol.* 2003; 95:471–8.
- Henderson TR,** Fay TN, Hamosh M. Effect of pasteurization on long chain polyunsaturated fatty acid levels and enzyme activities of human milk. *J Pediatr.* 1998; 132:876–8.
- Henderson-Smart DJ,** Steer PA. Caffeine versus theophylline for apnea in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010; 1–19.
- Hernell O,** Bläckberg L. Human milk bile salt-stimulated lipase: functional and molecular aspects. *J Pediatr.* 1994; 125:S56–61.
- Hill DR,** Newburg DS. Clinical applications of bioactive milk components. *Nutr Rev.* 2015; 73:463–76.
- HMBANA** (Human Milk Banking Association of North America). The value of human milk. 2017. Available from URL: <https://www.hmbana.org/sites/default/files/images/position-paper-donor-milk.pdf>.
- Holick MF.** Vitamin D deficiency. *N Engl J Med.* 2007; 357:266–81.
- Holsinger VH,** Rajkowski KT, Stabel JR. Milk pasteurisation and safety: a brief history and update. *Rev Sci Tech.* 1997; 16:441–51.
- Hoobler R.** Problems connected with the collection and production of human milk bank: *JAMA.* 1917; 66:421–5.
- Howlett A,** Ohlsson A, Plakkal N. Inositol for respiratory distress syndrome in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012; 14:CD000366.
- Hufnagel M,** Liese C, Loescher C, Kunze M, Proempeler H, et al. Enterococcal colonization of infants in a neonatal intensive care unit: associated predictors, risk factors and seasonal patterns. *BMC Infect Dis.* 2007; 7:107.
- Human Milk Bank Association of North America.** Guidelines for the establishment and operation of a donor Human Milk Bank. 2015.

- Human Milk Banking Association of South Africa.** Guidelines for the operation of a donor human milk bank in South Africa: best practice for the collection, storage and handling of human milk. 2011.
- Hunt KM,** Foster JA, Forney LJ, Schütte UME, Beck DL, et al. Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PLoS One*. 2011; 6:e21313.
- Igawa M,** Murase M, Mizuno K, Itabashi K. Is fat content of human milk decreased by infusion? *Pediatr Int*. 2014; 56:230–3.
- Israel-Ballard K,** Chantry C, Dewey K, Lönnerdal B, Sheppard H, et al. Viral, nutritional, and bacterial safety of flash-heated and Pretoria-pasteurized breast milk to prevent mother-to-child transmission of HIV in resource-poor countries: a pilot study. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005; 40:175–81.
- Jarvinen KM,** Laine ST, Jarvenpää AL, Suomalainen HK. Does low IgA in human milk predispose the infant to development of cow's milk allergy? *Pediatr Res*. 2000; 48:457–62.
- Jelliffe DB,** Jelliffe EFP. Human Milk in the Modern World. *Oxford. Oxford University Press*. 1979.
- Jeurink PV,** van Bergenhenegouwen J, Jiménez E, Knippels LM, Fernández L, et al. Human milk: a source of more life than we imagine. *Benef Microbes*. 2013; 4:17–30.
- Jiménez E,** Delgado S, Maldonado A, Arroyo R, Albújar M, et al. *Staphylococcus epidermidis*: a differential trait of the fecal microbiota of breast-fed infants. *BMC Microbiol*. 2008; 8:143.
- Jiménez E,** Espinosa I, Arroyo R, Fernández L, Rodríguez JM. Metagenomic analysis of human milk. 3rd Beneficial Microbes Conference. TNO: Noordwijkerhout, 2012a.
- Jin L,** Hinde K, Tao L. Species diversity and relative abundance of lactic acid bacteria in the milk of rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *J Med Primatol*. 2011; 40:52–8.
- Jones F.** History of North American donor milk banking: one hundred years of progress. *J Hum Lact*. 2003; 19:313–8.
- Jones MK,** Tomikawa M, Mohajer B, Tarnawski AS. Gastrointestinal mucosal regeneration: role of growth factors. *Front Biosci*. 1999; 4:D303–9.
- Jost T,** Lacroix C, Braegger CP, Rochat F, Chassard C, et al. Vertical mother-neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding. *Environ Microbiol*. 2014; 16:2891–904.
- Jóźwik M,** Jóźwik M, Teng C, Jóźwik M, Battaglia FC. Human breast milk sugars and polyols over the first 10 puerperium days. *Am J Hum Biol*. 2013; 25:198–204.
- Kainonen E,** Rautava S, Isolauri E. Immunological programming by breast milk creates an anti-inflammatory cytokine milieu in breast-fed infants compared to formula-fed infants. *Br J Nutr*. 2013; 109:1962–70.
- Kalliomaki M,** Ouwehand A, Arvilommi H, Kero P, Isolauri E. Transforming growth factor- $\beta$  in breast milk: a potential regulator of atopic disease at an early age. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104:1251–7.

- Kay HD**, Graham WR. The phosphate test for pasteurised milk. *J.Dairy Res.* 1935; 6:191–203.
- Kien CL**. Colonic fermentation of carbohydrate in the premature infant: possible relevance to necrotizing enterocolitis. *J Pediatr.* 1990; 117:S52–8.
- Kien CL**. Enteral carbohydrate assimilation. Chapter 22. In *Neonatal Nutrition and Metabolism*. 2<sup>nd</sup> ed. PJ Thureen, WW Hay (editors). Published by Cambridge University Press. 2006; 340–349.
- Kiersen JA**, Dimatteo DM, Locke RG, Mackley AB, Spear ML. Ghrelin and cholecystokinin in term and preterm human breast milk. *Acta Paediatr.* 2006; 95:991–5.
- Kim MJ**. Enteral nutrition for optimal growth in preterm infants. *Korean J Pediatr.* 2016; 59:466–70.
- Kingsley DH**, Hoover D, Papafragkou E, et al. Inactivation of hepatitis A virus and a calicivirus by high hydrostatic pressure. *J Food Prot.* 2002; 65:1605–9.
- Kingsley DH**. High pressure processing and its application to the challenge of virus-contaminated foods. *Food Environ Virol.* 2013; 5:1–12.
- Klotz D**, Joellenbeck M, Winkler K, Kunze M, Huzly D, et al. High temperature short time pasteurisation of human breast milk is efficient in retaining protein and reducing the bacterial count. *Acta Paediatr.* 2017; (Ahead of print). doi: 10.1111/apa.13768.
- Koenig A**, de Albuquerque Diniz EM, Barbosa SF, Vaz FA. Immunologic factors in human milk: the effects of gestational age and pasteurization. *J Hum Lact.* 2005; 21:439–43.
- Kojima M**, Kangawa K. Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev.* 2005; 85: 495–522.
- Koletzko B**, Boey CCM, Campoy C, Carlson SE, Chang N, Guillermo-Tuazon MA, et al. Current information and Asian perspectives on long-chain polyunsaturated fatty acids in pregnancy, lactation and infancy. Systematic review and practice recommendations from an Early Nutrition Academy workshop. *Ann Nutr Metab* 2014; 65:49–80.
- Koletzko B**. Human milk lipids. *Ann Nutr Metab.* 2016; 69:28–40.
- Kołodziejczyk A**, Borszewska-Kornacka MK. Monitored supplementation of vitamin D in preterm neonates—a primary report. *Dev Period Med.* 2015; 19:313–8.
- Kumar A**, Kumar P, Basu S. *Enterococcus faecalis* sepsis and leukemoid reaction: an unusual association at birth. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2015; 37:e419–20.
- Kunz C**, Meyer C, Collado MC, Geiger L, García-Mantrana I, et al. Influence of gestational age, secretor and Lewis blood group status on the oligosaccharide content of human milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2016; 6. [Epub ahead of print]
- L.2323–1** of the Public Health Code dated 3 December 2007 defining the good practice rules envisaged in paragraph 3. NOR: SJSM07220155. Lactariums de France. Association des Lactariums de France (Francia). Available at: [http://www.sdp.perinat-france.org/ADLF/files/lactarium\\_g](http://www.sdp.perinat-france.org/ADLF/files/lactarium_g)

- uide\_bonnes\_pratiques\_5\_janvier\_2008\_traduction\_anglais.pdf.
- Landers S**, Updegrave K. Bacteriological screening of donor human milk before and after Holder pasteurization. *Breastfeed Med*. 2010; 5:117–21.
- Landolfo S**, Gariglio M, Gribaudo G, et al. The human cytomegalovirus. *Pharmacol Ther*. 2003; 98:269–97.
- Lawrence RM**, Pane CA. Human breast milk: current concepts of immunology and infectious diseases. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 2007; 37:7–36.
- Lee da E**, Park S Y, Choi J S, Kim S Y, Lim J H, et al. Early second trimester maternal plasma levels of thrombin-inhibitor complexes and subsequent spontaneous preterm delivery. *Prenat Diagn*. 2012; 32:1170–3.
- Lefier D**, Grappin R, Pochet S. Determination of fat, protein, and lactose in raw milk by Fourier transform infrared spectroscopy and by analysis with a conventional filter-based milk analyzer. *J AOAC Int*. 1996; 79:711–7.
- Lepri L**, Del Bubba M, Maggini R, Donzelli GP, Galvan P. Effect of pasteurization and storage on some components of pooled human milk. *J Chromatogr B: Biomed Sci Appl*. 1997; 704:1–10.
- Lewandowski AJ**, Lamata P, Francis JM, Piechnik SK, Ferreira VM, et al. Breast milk consumption in preterm neonates and cardiac shape in adulthood. *Pediatrics*. 2016; 138: e20160050.
- Lewis ED**, Richard C, Larsen BM, Field CJ. The importance of human milk for immunity in preterm infants. *Clin Perinatol*. 2017; 44:23–47.
- Ley SH**, Hanley AJ, Stone D, O'Connor DL. Effects of pasteurization on adiponectin and insulin concentrations in donor human milk. *Pediatr. Res*. 2011; 70:278–81.
- Liebhaber M**, Lewiston NJ, Asquith MT, Olds-Arroyo L, Sunshine P. Alterations of lymphocytes and of antibody content of human milk after processing. *J. Pediatr*. 1977; 91:897–900.
- Lima MS**, Dimenstein R, Ribeiro KD. Vitamin E concentration in human milk and associated factors: a literature review. *J Pediatr (Rio J)*. 2014; 90:440–8.
- Lister DM**, Kotsanas D, Ballard SA, Howden BP, Carse E, et al. Outbreak of *vanB* vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* colonization in a neonatal service. *Am J Infect Control*. 2015; 43:1061–5.
- Lloyd ML**, Hod N, Jayaraman J, Marchant EA, Christen L, et al. Inactivation of cytomegalovirus in breast milk using ultraviolet-C irradiation: opportunities for a new treatment option in breast milk banking. *PLoS One*. 2016; 11:e0161116.
- Lodge CJ**, Tan DJ, Lau MX, Dai X, Tham R, et al. Breastfeeding and asthma and allergies: a systematic review and meta-analysis. *Acta Pediatr*. 2015; 104:38–53.
- Lönnerdal B**, Erdmann P, Thakkar SK, Sauser J, Destailats F. Longitudinal evolution of true protein, amino acids and bioactive proteins in breast milk: a

- developmental perspective. *J Nutr Biochem.* 2017; 41:1–11.
- Lucas A**, Cole TJ. Breast milk and neonatal necrotising enterocolitis. *Lancet.* 1990; 336:1519–23.
- Lundberg B**, Lindgren C, Palme-Kilander C, Örténstrand A, Bonamy AK, et al. Hospital-assisted home care after early discharge from a Swedish neonatal intensive care unit was safe and readmissions were rare. *Acta Paediatr.* 2016; 105:895–901.
- M'Rabet, L**, Vos AP, Boehm, G, Garssen J. Breast-feeding and its role in early development of the immune system in infants: consequences for health later in life. *J Nutr.* 2008; 138:1782S–90S.
- Maffei D**, Schanler RJ. Human milk is the feeding strategy to prevent necrotizing enterocolitis. *Semin Perinatol.* 2017; 41:36–40.
- Maggio L**, Costa S, Gallini F. Human milk fortifiers in very low birth weight infants. *Early Hum Dev.* 2009; 85:S59–61.
- Magnusson M**, Christiansson A, Svensson B. *Bacillus cereus* spores during housing of dairy cows: factors affecting contamination of raw milk. *J Dairy Sci.* 2007; 90:2745–54.
- Manual** de Calidad del Banco Regional de Leche Materna–Aladina–MGU Hospital 12 de Octubre. 2006. Edición 5ª.
- Marín ML**, Arroyo R, Jimenez E, Gomez A, Fernandez L, et al. Cold storage of human milk: effect on its bacterial composition. *J Ped Gastroenterol Nutr.* 2009; 49:343–8.
- Martin CR**, Ling PR, Blackburn GL. Review of infant feeding: key features of breast milk and infant formula. *Nutrients.* 2016; 8.
- Martín R**, Langa S, Reviriego C, Jiménez E, Marín ML, et al. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr.* 2003; 143:754–8.
- Martín V**, Mañés-Lázaro R, Rodríguez JM, Maldonado A. *Streptococcus lactarius* sp. nov., isolated from breast milk of healthy women. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2011; 61:1048–52.
- Martínez S**, López M, Bernardo A. Thermal inactivation of *Enterococcus faecium*: effect of growth temperature and physiological state of microbial cells. *Lett Appl Microbiol.* 2003; 37:475–81.
- Mateos-Vivas M**, Rodríguez-Gonzalo E, Domínguez-Álvarez J, García-Gómez D, Ramírez-Bernabé R, et al. Analysis of free nucleotide monophosphates in human milk and effect of pasteurisation or high-pressure processing on their contents by capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry. *Food Chem.* 2015; 174:348–55.
- Mayayo C**, Monteserrat M, Ramos SJ, Martínez-Lorenzo C, Calvo M, et al. Kinetic parameters for high-pressure-induced denaturation of lactoferrin in human milk. *Int Dairy J.* 2014; 39:246–52.
- Mayayo C**, Montserrat M, Ramos SJ, et al. Effect of high pressure and heat treatments on IgA immunoreactivity and lysozyme activity in human milk. *Eur Food Res Technol.* 2016; 242:891–8.
- McClure R**, Newell S. Randomized controlled study of digestive enzyme activity following trophic



- feeding. *Acta Paediatrica*. 2002; 91: 292–6.
- McCormick MC**, Litt JS, Smith VC, Zupancic JAF. Prematurity: An overview and public health implications. *Annual Rev Public Health*. 2011; 32:367–79.
- McGuire W**, Anthony MY. Donor human milk versus formula for preventing necrotising enterocolitis in preterm infants: systematic review. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2003; 88:F11–4.
- McMahon DJ**, Du H, McManus WR, Larsen KM. Microstructural changes in casein supramolecules during acidification of skim milk. *J Dairy Sci*. 2009; 92:5854–67.
- McPherson RJ**, Wagner CL. The effect of pasteurization on transforming growth factor alpha and transforming growth factor beta concentrations in human milk. *Adv Exp Med Biol*. 2001; 501:559–66.
- Mehta R**, Petrova A. Is variation in total antioxidant capacity of human milk associated with levels of bio-active proteins? *J Perinatol*. 2014; 34:220–2.
- Meier PP**, Johnson TJ, Patel AL, Rossman B. Evidence-based methods that promote human milk feeding of preterm infants: an expert review. *Clin Perinatol*. 2017; 44:1–22.
- Mimouni FB**, Lubetzky R, Yochpaz S, Mandel D. Preterm human milk macronutrient and energy composition: a systematic review and meta-analysis. *Clin Perinatol*. 2017; 44:165–72.
- Miranda M**, Gormaz M, Romero FJ, et al. Stability of the anti-oxidant capacity and pH of human milk refrigerated for 72 hours: longitudinal study. *Nutr Hosp*. 2011; 26:722–8.
- Mizuno K**, Sakurai M, Itabashi K. Necessity of human milk banking in Japan: Questionnaire survey of neonatologists. *Pediatr Int*. 2015; 57:639–4.
- Moles L**, Gómez M, Jiménez E, Fernández L, Bustos G, et al. Preterm infant gut colonization in the neonatal ICU and complete restoration 2 years later. *Clin Microbiol Infect*. 2015a; 21:936.e1–10.
- Moles L**, Manzano S, Fernández L, Montilla A, Corzo N, et al. Bacteriological, biochemical, and immunological properties of colostrum and mature milk from mothers of extremely preterm infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2015b; 60:120–6.
- Moltó-Puigmartí C**, Permanyer M, Castellote AI, López-Sabater MC. Effects of pasteurisation and high-pressure processing on vitamin C, tocopherols and fatty acids in mature human milk. *Food Chem*. 2011; 124:697–702.
- Monasterolo RC**, Pico MC, Martínez GR, de Pipaón MS. Guía de nutrición enteral en recién nacidos de muy bajo peso. Revisión sistemática de las evidencias científicas. Grupo de Nutrición y Metabolismo de la SEN. 2013; 7:84–110.
- Moon K**, Rao SC, Schulzke SM, Patole SK, Simmer K. Long chain polyunsaturated fatty acid supplementation in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016; 12:CD000375.
- Morriss FH Jr**, Brewer ED, Spedale SB, et al. Relationship of human milk pH during course of lactation

- to concentrations of citrate and fatty acids. *Pediatrics*. 1986; 78:458–64.
- Mosqueda E**, Sapiegiene L, Glynn L, Wilson-Costello D, Weiss M. The early use of minimal enteral nutrition in extremely low birth weight newborns. *J Perinatol*. 2008; 28:264–9.
- Moukarzel S**, Bode L. Human milk oligosaccharides and the preterm infant: a journey in sickness and in health. *Clin Perinatol*. 2017; 44:193–207.
- Mussa DM**, Ramaswamy H. Ultra high pressure pasteurization of milk: kinetics of microbial destruction and changes in physico-chemical characteristics. *Lebenson Wiss Technol*. 1997; 30:551–7.
- Nair RR**, Warner BB, Warner BW. Role of epidermal growth factor and other growth factors in the prevention of necrotizing enterocolitis. *Semin Perinatol*. 2008; 32:107–13.
- Nakagami T**, Ohno H, Shigehisa T, Otake T, Mori H, et al. Inactivation of human immunodeficiency virus by high hydrostatic pressure. *Transfusion*. 1996; 36:475–6.
- Nakagami T**, Shigehisa T, Ohmoria T, et al. Inactivation of herpes viruses by high hydrostatic pressure. *J Virol Methods*. 1992; 38:255–61.
- Nakamura K**, Kaneko M, Abe Y, Yamamoto N, Mori H, et al. Outbreak of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* transmitted through breast milk sharing in a neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect*. 2016; 92:42–6.
- Nako Y**, Tomomasa T, Morikawa A. Risk of hypervitaminosis D from prolonged feeding of high vitamin D premature infant formula. *Pediatr Int*. 2004; 46:439–43.
- Narayanan I**, Prakash K, Murthy NS, Gujral VV. Randomised controlled trial of effect of raw and holder pasteurised human milk and of formula supplements on incidence of neonatal infection. *Lancet*. 1984; 17:1111–3.
- Natarajan CK**, Sankar MJ, Agarwal R, Pratap OT, Jain V, Gupta N, Gupta AK, Deorari AK, Paul VK, Sreenivas V. Trial of daily vitamin D supplementation in preterm infants. *Pediatrics*. 2014; 133:e628–34.
- National Institute for Health and Clinical Excellence**. NICE clinical guideline 93. Donor breast milk banks: the operation of donor milk bank services. 2010; London, UK. Available at: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0033790/pdf/PubMedHealth\\_PMH0033790.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0033790/pdf/PubMedHealth_PMH0033790.pdf).
- Neu J**, Pammi Patole S. Strategies for prevention of feed intolerance in preterm neonates: a systematic review. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2005; 18:67–76.
- Newburg D**, Woo, J, Morrow A. Characteristics and potential functions of human milk adiponectin. *J. Pediatr*. 2010; 156:S41–6.
- Newburg DS**. Glycobiology of human milk. *Biochem (Mosc)*. 2013; 78:771–85.
- Nguyen DN**, Sangild PT, Ostergaard MV, Bering SB, Chatterton DE. Transforming growth factor- $\beta$ 2 and endotoxin interact to regulate homeostasis via interleukin-8 levels in the immature intestine.

- Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2014; 307:G689–99.
- Nikodémusz IN.** Appert and food preservation. *Orv Hetil.* 1987; 128:100–1.
- Ninonuevo MR,** Ward RE, LoCascio RG, German JB, Freeman SL, et al. Methods for the quantitation of human milk oligosaccharides in bacterial fermentation by mass spectrometry. *Anal Biochem.* 2007; 361:15–23.
- Nommsen-Rivers LA,** Dolan LM, Huang B. Timing of stage II lactogenesis is predicted by antenatal metabolic health in a cohort of primiparas. *Breastfeed Med.* 2012; 7:43–9.
- Novak FR,** Junqueira AR, Dias Mde S, Almeida JA. Sensorial analysis of expressed human milk and its microbial load. *J Pediatr (Rio J).* 2008; 84:181–4.
- Ochoa TJ,** Cleary TG. Effect of lactoferrin on enteric pathogens. *Biochimie.* 2009; 91:30–4.
- Oddy WH,** Halonen M, Martinez FD, Lohman IC, Stern DA, et al. TGF- $\beta$  in human milk is associated with wheeze in infancy. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112:723–8.
- Olano A,** Calvo M, Corzo N. Changes in the carbohydrate fraction of milk during heating processes. *Food Chem.* 1989; 31:259–65.
- Oliveira AMMM,** Marinho HA. Determination of Vitamin A in the milk of donor mothers from the human milk bank in Manaus/AM. Effect of processing. *Acta Amazon.* 2010; 40:59–64.
- OMS.** Appropriate technology for birth. *Lancet.* 1985; 2:436–7.
- OMS.** Nutrición del lactante y del niño pequeño. Estrategia mundial para la alimentación del lactante y del niño pequeño. Informe de la Secretaría. 55ª 16 de abril de 2002.
- Oo CY,** Burgio DE, Kuhn RC, Desai N, McNamara PJ. Pharmacokinetics of caffeine and its demethylated metabolites in lactation: predictions of milk to serum concentration ratios. *Pharm Res.* 1995; 12:313–6.
- Orloff SL,** Wallingford JC, McDougal JS. Inactivation of human immunodeficiency virus type I in human milk: effects of intrinsic factors in human milk and of pasteurization. *J Hum Lact.* 1993; 9:13–7.
- Oveisi MR,** Sadeghi N, Jannat B, Hajimahmoodi M, Behfar AO, et al. Human breast milk provides better antioxidant capacity than infant formula. *Iran J Pharm Res.* 2010; 9:445–9.
- Pardou A,** Serruys E, Mascart-Lemone F. Human milk banking: influence of storage processes and of bacterial contamination on some milk constituents. *Biol Neonate.* 1994; 65:302–9.
- Patel P,** Bhatia J. Total parenteral nutrition for the very low birth weight infant. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2017; 22:2–7.
- Peila C,** Emmerik NE, Giribaldi M, Stahl B, Ruitenberg JE, et al. Human milk processing: a systematic review of innovative techniques to ensure the safety and quality of donor milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2017; 64:353–36.
- Peila C,** Moro GE, Bertino E, Cavallarin L, Giribaldi M, et al. The effect of Holder pasteurization

- on nutrients and biologically-active components in donor human milk: a review. *Nutrients*. 2016; 8:477.
- Pellegrini M**, Marchei E, Rossi S, Vagnarelli F, Durgbanshi A, Gárla-Algar O, et al. Liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry assay for determination of nicotine and metabolites, caffeine and arecoline in breast milk. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2007; 21:2693–703.
- Penttilä I**. Milk-derived transforming growth factor- $\beta$  and the infant immune response. *J Pediatr* 2010; 156:S21–5.
- Penttilä IA**, van Spriel AB, Zhang MF, Xian CJ, Steeb CB, Cummins AG, et al. Transforming growth factor- $\beta$  levels in maternal milk and expression in postnatal rat duodenum and ileum. *Pediatr Res*. 1998; 44: 524–31.
- Perez PF**, Doré J, Leclerc M, Levenez F, Benyacoub J, et al. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? *Pediatrics*. 2007; 119:e724–32.
- Permanyer M**, Castellote C, Ramírez-Santana C, Audí C, Pérez-Cano FJ, et al. Maintenance of breast milk immunoglobulin A after high-pressure processing. *J. Dairy Sci*. 2010; 93:877–83.
- Peters MD**, McArthur A, Munn Z. Safe management of expressed breast milk: A systematic review. *Women Birth*. 2016; 29:473–81.
- Pfaender S**, Vielle NJ, Ebert N, Steinmann E, Alves MP, Thiel V. Inactivation of Zika virus in human breast milk by prolonged storage or pasteurization. *Virus Res*. 2017; 228:58–60.
- Picaud JC**, Buffin R. Human milk-treatment and quality of banked human milk. *Clin Perinatal*. 2017; 44:95–119.
- Pietschnig B**, Haschke F, Vanura H, Shearer M, Veitl V, et al. Vitamin K in breast milk: no influence of maternal dietary intake. *Eur J Clin Nutr*. 1993; 47:209–15.
- Polberger S**. III. Individualized fortification of human milk: targeted fortification. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2015; 6:S3–4.
- Quigley M**, McGuire W. Formula versus donor breast milk for feeding preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014; 22:CD002971.
- Radmacher PG**, Adamkin DH. Fortification of human milk for preterm infants. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2017; 22:30–5.
- Rastogi RP**, Richa, Kumar A, Tyagi MB, Sinha RP. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *J Nucleic Acids*. 2010; 16:592980.
- Rautava S**, Nanthakumar NN, Dubert-Ferrandon A, Lu L, Rautava J, et al. Breast milk-transforming growth factor- $\beta$  specifically attenuates IL-1 $\beta$ -induced inflammatory responses in the immature human intestine via an SMAD6- and ERK-dependent mechanism. *Neonatology*. 2011; 99:192–201.
- Rayyan M**, Rommel N, Allegaert K. The fate of fat: pre-exposure fat losses during nasogastric tube feeding in preterm newborns. *Nutrients*. 2015; 7:6213–23.

- RD 9/2014**, de 5 de julio de 2014. BOE páginas 52716-63. Available at: [http://www.boe.es/diario\\_boe/txt.php?id=BOEA-2014-7065](http://www.boe.es/diario_boe/txt.php?id=BOEA-2014-7065)).
- Realì A**, Greco F, Fanaro S, Atzei A, Puddu M, et al. Fortification of maternal milk for very low birth weight (VLBW) pre-term neonates. *Early Hum Dev.* 2010; 86:33–6.
- Rede Nacional de Bancos de Leite Humano**. [www.redeblh.fiocruz.br](http://www.redeblh.fiocruz.br).
- Rescigno M**, Urbano M, Valzasina B, Francolin M, Rotta G, et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature Immunol.* 2001; 2:361–7.
- Ribeiro KD**, Melo IL, Pisto AZ, Dimenstein R. The effect of processing on the vitamin A content of human milk. *J Pediatr.* 2005; 81:61–4.
- Richard C**, Lewis ED, Field CJ. Evidence for the essentiality of arachidonic and docosahexaenoic acid in the postnatal maternal and infant diet for the development of the infant's immune system early in life. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2016; 41:461–75.
- Rigourd V**, Meyer V, Kieffer F, Aubry S, Magny JF. HTLV and "donating" milk. *Bull Soc Pathol Exot.* 2011; 104:205–8.
- Rince A**, Flahaut S, Auffray Y. Identification of general stress genes in *Enterococcus faecalis*. *Int J Food Microbiol.* 2000; 55:87–91.
- Rinne MM**, Gueimonde M, Kalliomäki M, Hoppu U, Salminen SJ, et al. Similar bifidogenic effects of prebiotic-supplemented partially hydrolyzed infant formula and breastfeeding on infant gut microbiota. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2005; 43:59–65.
- Rodríguez NA**, Meier PP, Groer MW, Zeller JM, Engstrom JL, et al. A pilot study to determine the safety and feasibility of oropharyngeal administration of own mother's colostrum to extremely low-birth-weight infants. *Adv Neonatal Care.* 2010; 10:206–12.
- Rodríguez-Alcalá LM**, Fontecha J. Hot topic: Fatty acid and conjugated linoleic acid (CLA) isomer composition of commercial CLA-fortified dairy products: Evaluation after processing and storage. *J Dairy Sci.* 2007; 90:2083–90.
- Rogier EW**, Frantz AL, Bruno ME, Wedlund L, Cohen DA, et al. Secretory antibodies in breast milk promote long-term intestinal homeostasis by regulating the gut microbiota and host gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014; 111:3074–9.
- Roitt I**. Essential immunology. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 2006.
- Romeu-Nadal M**, Castellote AI, Gayà A, López-Sabater MC. Effect of pasteurisation on ascorbic acid, dehydroascorbic acid, tocopherols and fatty acids in pooled mature human milk. *Food Chem.* 2008; 107:434–8.
- Rosas R**, Sanz MP, Fernández-Calle P, Alcaide MJ, Montes MT, et al. Experimental study showed that adding fortifier and extra-hydrolysed proteins to preterm infant mothers' milk increased osmolality. *Acta Paediatr.* 2016; 105:e555–60.

- Rövekamp-Abels LW**, Hogewind-Schoonenboom JE, de Wijs-Meijler DP, Maduro MD, Jansen-van der Weide MC, et al. Intermittent bolus or semicontinuous feeding for preterm infants? *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2015; 61:659–64.
- Ryu JE**. Caffeine in human milk and in serum of breast-fed infants. *Dev Pharmacol Ther.* 1985; 8:329–37.
- Sachs HC**. Committee on Drugs. The transfer of drugs and therapeutics into human breast milk: An update on selected topics. *Pediatrics.* 2013; 132:e796–e809.
- Sango DM**, Abela D, McElhatton A, Valdramidis VP. Assisted ultrasound applications for the production of safe foods. *J Appl Microbiol.* 2014; 116:1067–83.
- Sanz Y**. Gut microbiota and probiotics in maternal and infant health. *Am J Clin Nutr.* 2011; 94:2000S–5S.
- Sarkar S**. Microbiological considerations: pasteurized milk. *Int J Dairy Sci.* 2015; 10: 206–18.
- Savilahti E**, Siltanen M, Kajosaari M, Vaarala O, Saarinen KM. IgA antibodies, TGF- $\beta$ 1 and - $\beta$ 2, and soluble CD14 in the colostrum and development of atopy by age 4. *Pediatr Res.* 2005; 58:1300–5.
- Savino F**, Liguori SA, Fissore MF, Oggero R. Breast milk hormones and their protective effect on obesity. *Int J Pediatr Endocrinol.* 2009; 2009:327505.
- Savino F**, Liguori SA, Petrucci E, Lupica MM, Fissore MF, et al. Evaluation of leptin in breast milk, lactating mothers and their infants. *Eur J Clin Nutr.* 2010; 64: 972–7.
- Savino F**, Sardo A, Rossi L, Benetti S, Savino A, et al. Mother and infant body mass index, breast milk leptin and their serum leptin values. *Nutrients.* 2016; 8:383.
- Schanler J**, Shulman RJ, Lau C. Feeding strategies for premature infants: Beneficial outcomes of feeding fortified human milk versus preterm formula. *Pediatrics.* 1999; 103:1150–7.
- Schanler RJ**. Evaluation of the evidence to support current recommendations to meet the needs of premature infants: The role of human milk. *Am J Clin Nutr.* 2007; 85:625S–8S.
- Schanler RJ**. Outcomes of human milk-fed premature infants. *Semin Perinatol.* 2011; 35:29–33.
- Schanler RJ**. Overview: The clinical perspective. *J Nutr.* 2000; 130:417S–9S.
- Schneider N**, Garcia-Rodenas CL. Early nutritional interventions for brain and cognitive development in preterm infants: a review of the literature. *Nutrients.* 2017; 23:9.
- Shama G**. Ultraviolet light. In: Robinson RK, Batt C, Patel P, eds. *Encyclopedia of Food Microbiology*. 3<sup>rd</sup> ed. London: Academic Press; 1999:2208–14.
- Sharma D**, Farahbakhsh N, Sharma S, Sharma P, Sharma A. Role of Kangaroo mother care in growth and breast feeding rates in very low birth weight (VLBW) neonates: A systematic review. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2017; 8:1–29.
- Shehadeh N**, Aslih N, Shihab S, Werman MJ, Sheinman R, et al. Human milk beyond one year post-partum: lower content of protein,

- calcium, and saturated very long-chain fatty acids. *J Pediatr*. 2006; 148:122–4.
- Shulhan J**, Dicken B, Hartling L, Larsen BM. Current knowledge of necrotizing enterocolitis in preterm infants and the impact of different types of enteral nutrition products. *Adv Nutr*. 2017; 17:80–91.
- Silva JL**, Luan P, Glasser M, Voss EW, Weber G, et al. Effect of hydrostatic pressure on a membrane-enveloped virus: high immunogenicity of the pressure inactivated virus. *J Virol*. 1992; 66:2111–7.
- Silva Laport M**, da Silva MR, Costa Silva C, do Carmo de Freire Bastos M, Giambiagi-deMarval M. Heat-resistance and heat-shock response in the nosocomial pathogen *Enterococcus faecium*. *Curr Microbiol*. 2003; 46:313–7.
- Silvestre D**, Ferrer E, Gayá J, Jareño E, Miranda M, et al. Available lysine content in human milk: Stability during manipulation prior to ingestion. *Biofactors*. 2006; 26:71–9.
- Silvestre D**, Miranda M, Muriach M, Almansa I, Jareno E, et al. Antioxidant capacity of human milk: effect of thermal conditions for the pasteurization. *Acta Paediatr*. 2008; 97:1070–4.
- Silvestre D**, Ruiz P, Martínez-Costa C, Plaza A, López MC. Effect of pasteurization on the bactericidal capacity of human milk. *J Hum Lact*. 2008; 24:371–6.
- Simmer K**, Hartmann B. The knowns and unknowns of human milk banking. *Early Hum Dev*. 2009; 85:701–4.
- Simmer K**. Human milk banks and evidence-based medicine. *J Paediatr Child Health*. 2000; 36:182–3.
- Singhal A**, Cole TJ, Lucas A. Early nutrition in preterm infants and later blood pressure: two cohorts after randomised trials. *Lancet*. 2001; 357:413–9.
- Sisk PM**, Lambeth TM, Rojas MA, Lightbourne T, Barahona M, et al. Necrotizing enterocolitis and growth in preterm infants fed predominantly maternal milk, pasteurized donor milk, or preterm formula: a retrospective study. *Am J Perinatol*. 2016. (Ahead of print). Doi: 10.1055/s-0036-1597326.
- Sjöström ES**, Öhlund I, Ahlsson F, Domellöf M. intakes of micronutrients are associated with early growth in extremely preterm infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2016; 62:885–92.
- Slutzah M**, Codipilly CN, Potak D, et al. Refrigerator storage of expressed human milk in the neonatal intensive care unit. *J Pediatr*. 2010; 156:26–8.
- Smelt JM**. Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends Food Sci Technol*. 1998; 9:152–8.
- Smilowitz JT**, Gho DS, Mirmiran M, German JB, Underwood MA. Rapid measurement of human milk macronutrients in the neonatal intensive care unit: accuracy and precision of fourier transform mid-infrared spectroscopy. *J Hum Lact*. 2014; 30:180–9.
- Smith KM**, Eaton AD, Finlayson LM, Garside P. Oral tolerance. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:S175–8.

- Soto A**, Martín V, Jiménez E, Mader I, Rodríguez JM, Fernández L. Lactobacilli and bifidobacteria in human breast milk: influence of antibiotherapy and other host and clinical factors. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2014; 59:78–88.
- Sousa SG**, Delgadillo I, Saraiva JA. Human milk composition and preservation: evaluation of high-pressure processing as a nonthermal pasteurization technology. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2016; 56:1043–60.
- Sousa SG**, Santos MD, Fidalgo LG, Delgadillo I, Saraiva JA. Effect of thermal pasteurisation and high-pressure processing on immunoglobulin content and lysozyme and lactoperoxidase activity in human colostrum. *Food Chem.* 2014; 151:79–85.
- Springer S**. Human milk banking in Germany. *J Human Lact.* 1997; 13:65–8.
- Stahl B**, Thurl S, Henker J, Siegel M, Finke B, et al. Detection of four human milk groups with respect to Lewis-blood-group-dependent oligosaccharides by serologic and chromatographic analysis. *Adv Exp Med Biol.* 2001; 501:299–306.
- Stavchansky S**, Combs A, Segraves R, Delgado M, Joshi A. Pharmacokinetics of caffeine in breast milk and plasma after single oral administration of caffeine to lactating mothers. *Biopharm Drug Dispos.* 1988; 9:285–99.
- Stenfors Arnesen LP**, Fagerlund A, Granum PE. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Rev.* 2008; 32:579–606.
- Stock K**, Griesmaier E, Brunner B, Neubauer V, Kiechl-Kohlendorfer U, et al. Pasteurization of breastmilk decreases the rate of postnatally acquired cytomegalovirus infections, but shows a non-significant trend to an increased rate of necrotizing enterocolitis in very preterm infants—a preliminary study. *Breastfeed Med.* 2015; 10:113–7.
- Talbot F**. An organization for supplying milk. *N Engl J Med.* 1928; 199:610–1.
- Tannock GW**. More than smell: the complexity of the normal microflora. En: Normal microflora. An introduction to microbes inhabiting the human body. London: Chapman and Hall. 1995:1–35.
- Terpstra FG**, Rechtman DJ, Lee ML, Hoeij KV, Berg H, et al. Antimicrobial and antiviral effect of high-temperature short-time (HTST) pasteurization applied to human milk. *Breastfeed Med.* 2007; 2:27–33.
- Thorley V**. Human milk use in Australian hospitals, 1949–1985. *Breastfeed Rev.* 2012; 20:13–23.
- Tremblay G**, Boudreau C, Bélanger S, St-Onge O, Pronovost E, et al. Body composition in very preterm infants: role of neonatal characteristics and nutrition in achieving growth similar to term infants. *Neonatology.* 2016; 111:214–21.
- Tudehope DI**. Human milk and the nutritional needs of preterm infants. *J Pediatr.* 2013; 162:S17–25.
- Tuladhar R**, Patole SK, Koh TH, et al. Refractory *Bacillus cereus*



- infection in a neonate. *Int J Clin Pract.* 2000; 54:345–7.
- Tully MR.** A year of remarkable growth for donor milk banking in North America. *J Human Lact.* 2000; 16:235–6.
- Tully MR.** Human milk banking in Sweden and Denmark. *J Human Lact.* 1991; 7:145–6.
- Turfkruyer M, Verhasselt V.** Breast milk and its impact on maturation of the neonatal immune system. *Curr Opin Infect Dis.* 2015; 28:199–206.
- Tyralla EE, Dodson WE.** Caffeine secretion into breast milk. *Arch Dis Child.* 1979; 54:787–800.
- U.S. Department of Health and Human Services.** The Surgeon General's Call to Action to Support Breastfeeding. 2011. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK52682/>.
- Underwood MA, Gaerlan S, De Leoz ML, et al.** Human milk oligosaccharides in premature infants: absorption, excretion, and influence on the intestinal microbiota. *Pediatr Res.* 2015; 78:670–7.
- Underwood MA.** Human milk for the premature infant. *Pediatr Clin North Am.* 2013; 60:189–207.
- Underwood MA.** Missed opportunities: the cost of suboptimal breast milk feeding in the neonatal intensive care unit. *J Pediatr.* 2016; 175:12–4.
- United Kingdom Association for Milk Banking.** Guidelines for the establishment and operation of human milk banks in the UK. 3<sup>rd</sup> Edition, 2003. [www.ukamb.org](http://www.ukamb.org).
- Untalan PB, Keeney SE, Palkowetz KH, Rivera A, Goldman AS.** Heat susceptibility of interleukin-10 and other cytokines in donor human milk. *Breastfeed Med.* 2009; 4:137–44.
- Utrera Torres MI, Medina López C, Vázquez Román S, Alonso Díaz C, Cruz-Rojo J, et al.** Does opening a milk bank in a neonatal unit change infant feeding practices? A before and after study. *Int Breastfeed J.* 2010; 5:4.
- Valentine CJ, Morrow BS, Fernandez S, Gulati P, Bartholomew D, et al.** Docosahexaenoic acid and amino acid contents in pasteurized donor milk are low for preterm infants. *J Pediatr.* 2010; 157:906–10.
- Valentine CJ, Wagner CL.** Nutritional management of the breastfeeding dyad. *Pediatr Clin North Am.* 2013; 60:261–74.
- Van Zoeren-Grobbe D, Schrijver J, Van den Berg H, Berger HM.** Human milk vitamin content after pasteurisation, storage, or tube feeding. *Arch Dis Child.* 1987; 62:161–5.
- Vázquez Román S, Alonso Díaz C, Medina López C, Bustos Lozano G, Martínez Hidalgo M, et al.** Setting up a donor milk bank within a neonatal unit. *An Pediatr.* 2009; 71:343–8.
- Vázquez-Román S, Bustos-Lozano G, López-Maestro M, Rodríguez-López J, Orbea-Gallardo C, et al.** Clinical impact of opening a human milk bank in a neonatal unit. *An Pediatr (Barc).* 2014; 81:155–60.
- Vázquez-Román S, Escuder-Vieco D, García-Lara NR, Alonso-Díaz C, Lora D, et al.** Impact of freezing time on Dornic acidity in three

- types of milk: raw donor milk, mother's own milk, and pasteurized donor milk. *Breastfeed Med.* 2016; 11:91–3.
- Vázquez-Román S**, Garcia-Lara NR, Escuder-Vieco D, Chaves-Sánchez F, De la Cruz-Bertolo J, et al. Determination of Dornic acidity as a method to select donor milk in a milk bank. *Breastfeed Med.* 2013; 8:99–104.
- Veldhoen M**, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGF  $\beta$  in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity.* 2006; 24:179–89.
- Verhasselt V**. Neonatal tolerance under breastfeeding influence: the presence of allergen and transforming growth factor- $\beta$  in breast milk protects the progeny from allergic asthma. *J Pediatr* 2010; 156:S16–20.
- Viazis S**, Farkas BE, Allen JC. Effects of high-pressure processing on immunoglobulin A and lysozyme activity in human milk. *J Hum Lact.* 2007; 23:253–61.
- Viazis S**, Farkas BE, Jaykus LA. Inactivation of bacterial pathogens in human milk by high-pressure processing. *J Food Prot.* 2008; 71:109–18.
- Vieira AA**, Soares FV, Pimenta HP, Abranches AD, Moreira ME. Analysis of the influence of pasteurization, freezing/thawing, and offer processes on human milk's macronutrient concentrations. *Early Hum Dev.* 2011; 87:577–80.
- Vogiatzi MG**, Jacobson-Dickman E, DeBoer MD. Drugs, and Therapeutics Committee of The Pediatric Endocrine Society. Vitamin D supplementation and risk of toxicity in pediatrics: a review of current literature. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014; 99:1132–41.
- Wada Y**, Lönnerdal B. Bioactive peptides released from in vitro digestion of human milk with or without pasteurization. *Pediatr Res.* 2015; 77:546–53.
- Wagner CL**, Greer FR. Prevention of rickets and vitamin D deficiency in infants, children, and adolescents. *Pediatrics.* 2008; 122:1142–52.
- Wang B**. Molecular mechanism underlying sialic acid as an essential nutrient for brain development and cognition. *Adv Nutr.* 2012; 3:465S–72S.
- Wardell JM**, Hill CM, D'Souza SW. Effect of pasteurization and of freezing and thawing human milk on its triglyceride content. *Acta Paediatr Scand.* 1981; 70:467–71.
- Wardell JM**, Wright AJ, Bardsley WG, D'Souza SW. Bile salt-stimulated lipase and esterase activity in human milk after collection, storage, and heating: nutritional implications. *Pediatr Res.* 1984; 18:382–6.
- Warner BW**, Warner BB. Role of epidermal growth factor in the pathogenesis of neonatal necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg.* 2005; 14:175–80.
- Weaver LT**, Arthur HM, Bunn JE, Thomas JE. Human milk IgA concentrations during the first year of lactation. *Arch Dis Child.* 1998; 78:235–9.
- Weber G**, Drickamer HG. The effect of high pressure upon proteins and other biomolecules. *Q Rev Biophys.* 1983; 16:89–112.

- West Hartford, CT.** Guidelines for the establishment and operation of a human milk bank. LDW Arnold, M Tully, Eds. 1990.
- WHO** (World Health Organization). Donor human milk for low-birth-weight infants. 2017. Available from [URL: http://www.who.int/elena/titles/donormilk\\_infants/en/](http://www.who.int/elena/titles/donormilk_infants/en/)
- WHO** (World Health Organization). e-Library of Evidence for Nutrition Actions (eLENA). 2015. Available at: [http://www.who.int/elena/titles/donormilk\\_infants/en/index.html#](http://www.who.int/elena/titles/donormilk_infants/en/index.html#).
- Wight NE**, Morton JA, Kim JH. Best Medicine: Human Milk in the NICU. Amarillo, Texas, USA 2008.
- Williamson S**, Finucane E, Ellis H, et al. Effect of heat treatment of human milk on absorption of nitrogen, fat, sodium, calcium, and phosphorus by preterm infants. *Arch Dis Child*. 1978; 53:555–63.
- Wojcik KY**, Rechtman DJ, Lee ML, Montoya A, Medo ET. Macronutrient analysis of a nationwide sample of donor breast milk. *J Am Diet Assoc*. 2009; 109:137–40.
- Woo JG**, Guerrero ML, Altaye M, Ruiz-Palacios GM, Martin LJ, Dubert-Ferrandon A, Newburg DS, Morrow AL. Human milk adiponectin is associated with infant growth in two independent cohorts. *Breastfeed Med*. 2009; 4:101–9.
- Woo JG**, Martin LJ. Does breastfeeding protect against childhood obesity? Moving beyond observational evidence. *Curr Obes Rep*. 2015; 4: 207–16.
- Zasada M**, Kwinta P, Durlak W, Bik-Multanowski M, Madetko-Talowska A, et al. Development and maturation of the immune system in preterm neonates: results from a whole genome expression study. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:498318.
- Zhang Q**, Cundiff JK, Maria SD, McMahon RJ, Wickham MS, et al. Differential digestion of human milk proteins in a simulated stomach model. *J Proteome Res*. 2014; 13:1055–64.

**XII.**

**ANEXOS**

---



## ANEXO XII.1. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN TEMPORAL PARA LAS DONANTES DE LECHE DEL BRLM

CRITERIO	TIEMPO DE EXCLUSIÓN
<b>1. Infección aguda:</b>	
- Respiratoria, diarrea infecciosa, mononucleosis o fiebre sin filiar	1 semana tras desaparecer la sintomatología
- Varicela y sarampión	4 semanas
- Hepatitis aguda	Hasta conocer la etiología
- Herpes tipo I recurrente / zoster	Una semana tras la curación
<b>2. Tuberculosis y Brucelosis</b> (incluido el contacto tuberculoso sin estudiar y sin profilaxis).	2 años desde la recuperación completa y curación confirmada de la enfermedad 2 meses desde el fin de la profilaxis antituberculosa
<b>3. Mastitis o infección cutánea en área de la mama</b>	Hasta su resolución
<b>4. Otras infecciones</b>	Consultar al médico responsable del banco de leche
<b>5. Riesgo de contraer una infección transmisible:</b>	
- Endoscopia (todos los tipos esofagogastroscoopia, colonoscopia, cistoscopia, broncoscopia...)	El tiempo de exclusión (en todas las situaciones referidas) dependerá de la sensibilidad de las pruebas de laboratorio utilizadas para la detección del virus de la hepatitis C:  - 6 meses desde la exposición en caso de utilizar serologías como prueba de despistaje  - 4 meses desde la exposición en caso de utilizar tecnología de amplificación genómica del ácido nucleico (NAT) como prueba de detección del virus de la hepatitis B y C  - La administración repetida de inmunoglobulinas polivalentes sí supone una contraindicación
- Salpicadura de sangre a mucosa o pinchazo con aguja potencialmente contagiosa	
- Tatuajes grabados y <i>piercings</i>	
- Acupuntura, salvo la efectuada con agujas desechables	
- Transfusión de componentes sanguíneos, incluida transfusión intrauterina al feto	
- Trasplante de tejidos o células de origen humano	
- Dosis repetidas de inmunoglobulinas polivalentes	

<b>6. Cirugía</b>	No supone un criterio de exclusión temporal la cirugía mayor sin transfusión (incluyendo la cesárea), la cirugía menor o las extracciones dentales realizadas en condiciones higiénicas adecuadas
<b>7. Vacuna de la fiebre amarilla</b>	No se recomienda la vacunación durante la lactancia materna  En caso de alto riesgo epidemiológico para la madre/niño se recomienda vacunar sólo a mujeres lactantes cuyo hijo tenga más de 9 meses. En dicho caso, se mantendrá un periodo de exclusión temporal de 4 semanas tras la vacunación
<b>8. Otras vacunas</b>	Las vacunas frente a la varicela, tuberculosis (de Bacillus de Calmette y Guérin o BCG), fiebre tifoidea (oral) y polio (oral; no comercializada ya en España) no suponen riesgo para la lactancia materna ni, por tanto, para la donación de leche
<b>9. Consumo temporal de medicación o productos de herbolario que contraindiquen la lactancia materna, o megadosis de vitaminas A, C, B<sub>6</sub> o E</b>	Mientras dure el consumo
<b>10. Exposición a radiofármacos (isótopos radioactivos)</b>	En función de la vida media del radiofármaco. Consultar al médico responsable. Información en <a href="http://www.e-lactancia.org/">http://www.e-lactancia.org/</a>

## ANEXO XII.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN DEFINITIVA PARA LAS DONANTES DE LECHE DEL BRLM

---

### CRITERIO Y DESCRIPCIÓN

---

#### 1. Enfermedades infecciosas activas o padecidas

---

- Portadoras de antígeno de superficie de la hepatitis B (Ag HBs)
- Portadoras de virus de la hepatitis C
- Marcadores positivos de sífilis
- Infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) tipos 1 y 2
- Infección por el virus linfotrófico de células T humanas (HTLV, por su acrónimo en inglés) tipos I y II.
- Otras infecciones adquiridas por vía sexual, tanto actuales como pasadas, debidas al virus del papiloma humano y al virus del herpes simple tipo 1 ó 2 de localización genital/anal, infección por *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* o *Trichomonas vaginalis*, suponen una contraindicación de la donación de leche ya que traducen una conducta sexual de riesgo

Nota: La enfermedad de Chagas (infección por *Trypanosoma cruzi*) no supone una contraindicación porque, aunque pueda estar presente en leche materna, la pasteurización destruye al microorganismo.

---

#### 2. Conducta sexual o relaciones sexuales de riesgo

---

- Mantener relaciones sexuales con múltiples parejas actualmente
- Mantener relaciones sexuales con una pareja que:
- Padezca cualquiera de las infecciones del criterio 1 (con la excepción de mujeres no portadoras, vacunadas previamente de hepatitis B, con pareja portadora de Ag HBs)
- Consuma drogas por vía intravenosa
- Padezca una enfermedad que precise transfusiones frecuentes de hemoderivados

---

#### 3. Consumo actual de tóxicos

---

- Drogas ilegales (heroína, cocaína, marihuana, etc.) o metadona
- Consumo habitual de alcohol (cualquier cantidad)
- Consumo habitual de tabaco (cualquier cantidad) o productos que contienen nicotina (parches, chicles), así como el uso del cigarrillo electrónico
- Más de 2 bebidas que contengan cafeína al día

---

#### 4. Antecedente de consumo de heroína

---

---

#### 5. Consumo de medicación o productos de herbolario que contraindiquen la lactancia materna. Megadosis de vitaminas A, C, B<sub>6</sub> o E

---



---

Ver páginas:

<http://www.e-lactancia.org> (nivel de riesgo  $\geq 2$ )

<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?LACT>

Si el consumo es temporal, la exclusión será temporal.

---

## **6. Dieta ovolactovegetariana o vegana sin suplementos adecuados durante el embarazo y la lactancia**

---

Deben seguirse las recomendaciones nutricionales pertinentes para evitar deficiencias nutricionales en relación con el hierro, el zinc, la vitamina D, los ácidos grasos poliinsaturados omega 3 y la vitamina B<sub>12</sub>

*Criterios de una suplementación adecuada de vitamina B<sub>12</sub> durante el embarazo y la lactancia según recomendación de la Academia Americana de Dietética:*

-Suplemento diario de 30-100 mcg

-Suplemento semanal: dos dosis de 1000 mcg tomadas en diferentes días de la semana

Se recomiendan los preparados de vitamina B<sub>12</sub> sin otras vitaminas u oligoelementos, ya que su absorción es mejor.

*Para poder ser admitida como donante, la ingesta de suplementos debe haber sido adecuada durante el embarazo y la lactancia.*

Es recomendable la ingesta de productos enriquecidos con vitamina B<sub>12</sub> (leche, productos derivados de soja y cereales)

Si la suplementación se realiza de forma adecuada, no será necesario realizar controles analíticos para evaluar los niveles de la vitamina B<sub>12</sub> en el organismo

Pueden consultarse las recomendaciones para una dieta adecuada en el embarazo y la lactancia de mujeres que siguen una dieta vegetariana en <http://www.veganhealth.org/b12/rec>

---

## **7. Enfermedades crónicas o sistémicas debilitantes o mal controladas**

---

## **8. Encefalopatías espongiiformes transmisibles (EET)**

---

En relación a las formas adquiridas de la enfermedad:

a) Mujeres que padezcan la enfermedad

b) Mujeres que hayan:

- Permanecido en el Reino Unido, Gibraltar, Isla de Man o islas del Canal más de 12 meses, entre 1980 y 1996, de forma continuada o intermitente

- Recibido un trasplante de córnea o duramadre.

- Recibido hormona de crecimiento entre 1958 y 1986.

En relación a las formas hereditarias de la enfermedad:

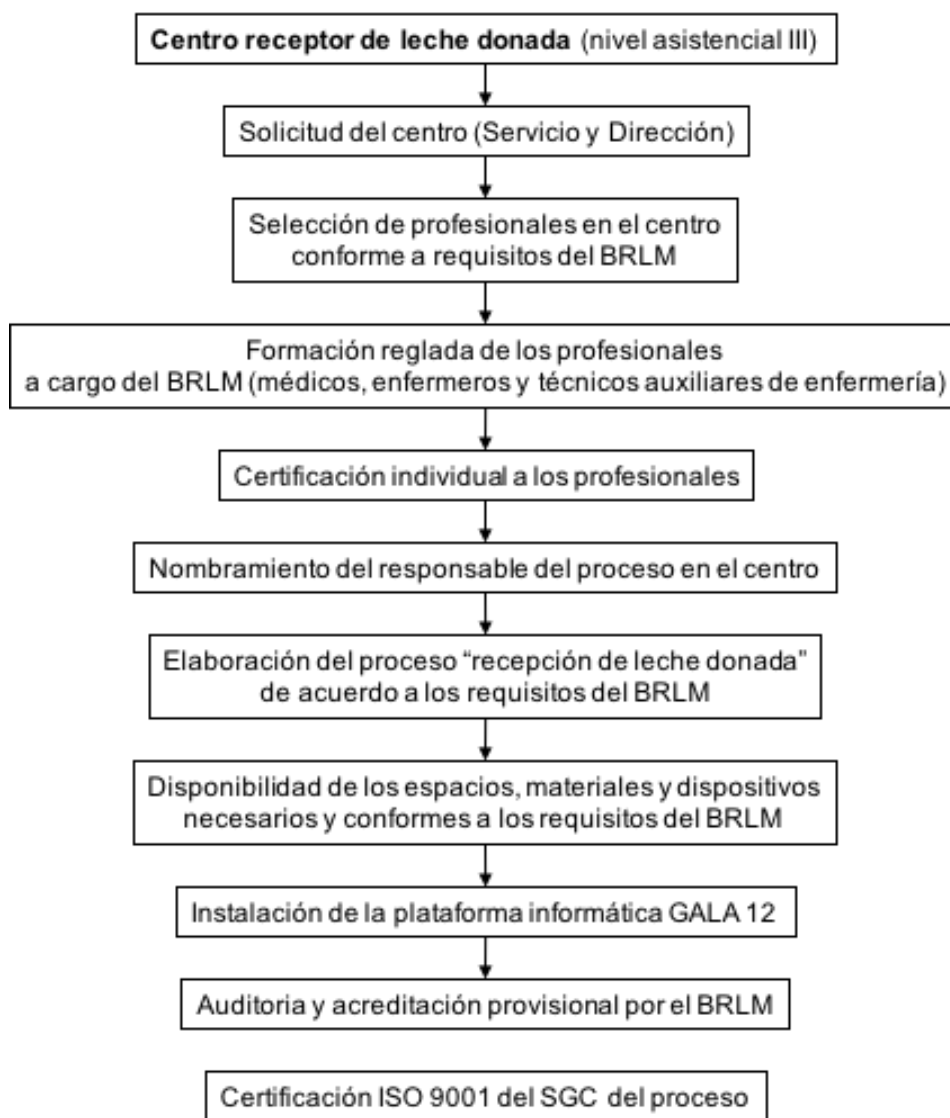
a) Mujeres que padezcan una de estas formas de enfermedad

b) Mujeres que tengan un familiar de primer grado que padezca la enfermedad y se desconozca su estado de portadora de la enfermedad

---

### ANEXO XII.3. DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA ACREDITACIÓN DE CENTROS SATÉLITE PARA RECEPCIÓN DE LECHE DONADA. FASE I.

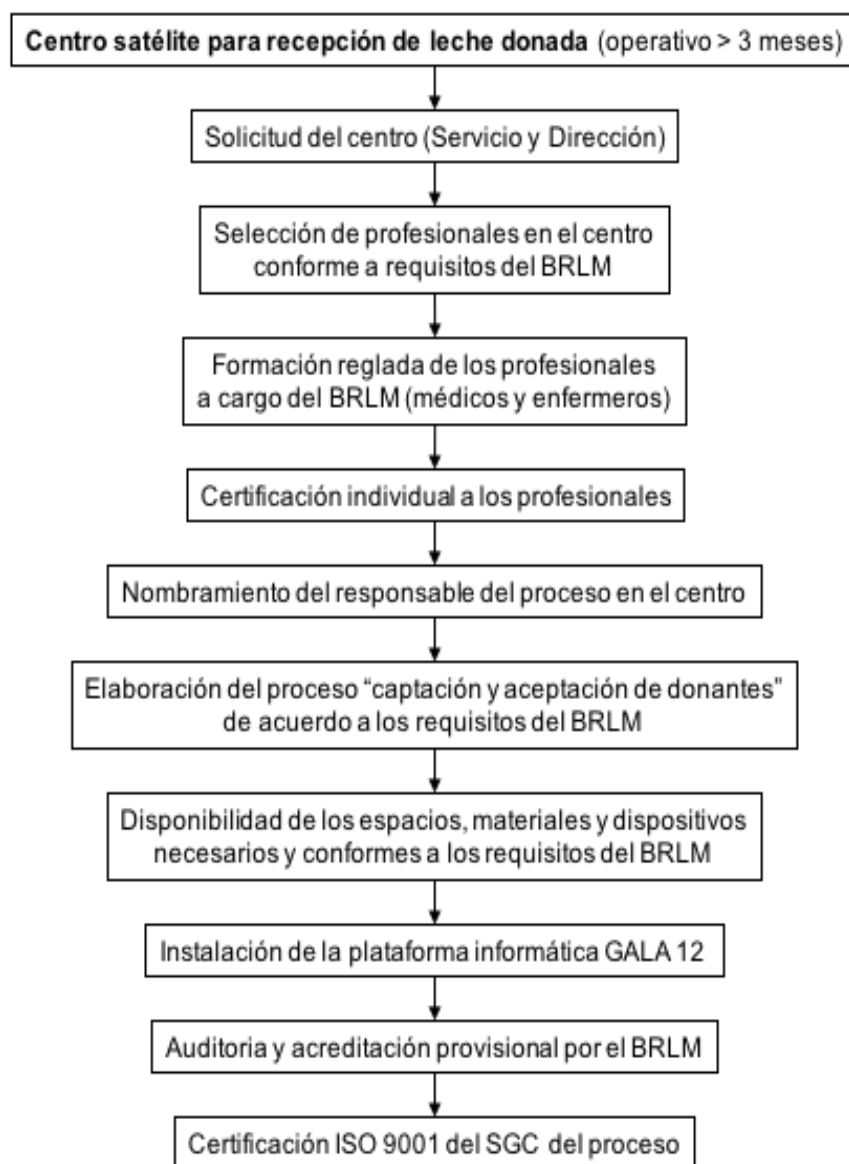
#### Fase I: acreditación de centros satélite para recepción de leche donada



Fuente: Manual de calidad del BRLM (2016)

## ANEXO XII.4. DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA ACREDITACIÓN DE CENTROS SATÉLITE PARA LA CAPTACIÓN Y ACEPTACIÓN DE DONANTES. FASE II.

### Fase II: acreditación de centros satélite para la captación y aceptación de donantes



Fuente: Manual de calidad BRLM (2016)

## XII.5. LISTADO DE FIGURAS

**Figura 1.** Factores que afectan a la composición de la leche materna.

**Figura 2.** Diagrama de flujo de la vía clínica para extracción, conservación y administración de leche materna a los RNs hospitalizados en el Servicio de Neonatología del Hospital 12 de Octubre.

**Figura 3.** Estructura del glóbulo de grasa de la leche materna.

**Figura 4.** Situación actual de los bancos de leche en Europa.

**Figura 5.** Logotipos identificadores de: a) el primer Banco de Leche del Hospital 12 de Octubre; y b) el Banco Regional de Leche Materna Aladina-MGU del Hospital 12 de Octubre.

**Figura 6.** Diagrama de flujo de los procesos operativos.

**Figura 7.** Mapa de procesos del BRLM-AMGU-Hospital 12 de Octubre.

**Figura 8.** Diagrama de flujo del proceso de selección de donantes.

**Figura 9.** Técnica para una correcta higiene de manos.

**Figura 10.** Extracción manual de leche mediante la técnica Marmet.

**Figura 11.** Diagrama de flujo proceso de donación.

**Figura 12.** Diagrama de flujo de los controles de calidad de la leche cruda y pasteurizada.

**Figura 13.** Imágenes de los controles de calidad de la leche cruda y de la pasteurización Holder en el BRLM.

**Figura 14.** Esquema de la distribución de leche pasteurizada a las Unidades de Neonatología.

**Figura 15.** Sistema de funcionamiento del FoneAstra.

**Figura 16.** Instalación experimental para el tratamiento de leche materna con radiación UV-C.

**Figura 17.** Análisis de componentes principales de 10 lotes de leche donada sometidos a distintos tratamientos térmicos.

**Figura 18.** Heat map de la tasa de retención de aquellas variables que contribuyen de manera significativa al PCA de 10 lotes de leche donada sometida a diferentes tratamientos térmicos.

**Figura 19.** Agrupamiento jerárquico (método *average*) obtenido tras calcular el coeficiente de correlación de Speraman de la matriz escalada (Z-score) de las tasas de retención de las variables que más contribuyen a la separación de los distintos tratamientos de los 10 lotes de leche donada empleados en el análisis multivariado ( $\cos^2 > 0,2$  en PCA).

## XII.6. LISTADO DE TABLAS

**Tabla 1.** Composición (%) y características de las fórmulas de prematuros disponibles en el mercado (por 100 g de producto).

**Tabla 2.** Recomendaciones proteicas en recién nacidos con <1.200 g y >1.200 g de peso.

**Tabla 3.** Comparación entre la concentración de proteína total (g/dL) en la leche de madres con niños pretérmino y en la leche de madres con niños a término.

**Tabla 4.** Comparación entre la concentración de grasa (g/dL) en la leche de madres con niños pretérmino y en la leche de madres con niños a término.

**Tabla 5.** Comparación entre la concentración de lactosa (g/dL) en la leche de madres con niños pretérmino y en la leche de madres con niños a término.

**Tabla 6.** Especies bacterianas aisladas o detectadas mediante técnicas moleculares en leche de mujeres sanas.

**Tabla 7.** Composición bioquímica y energía del calostro y la leche madura.

**Tabla 8.** Composición en vitaminas y minerales del calostro y la leche madura.

**Tabla 9.** Actividad biológica de los principales componentes de la leche humana.

**Tabla 10.** Descripción de los procesos del BRLM.

**Tabla 11.** Márgenes de variación permitidos en los parámetros de proceso durante la pasteurización Holder.

**Tabla 12.** Criterios microbiológicos para la leche cruda de acuerdo con las guías de procesamiento de la leche donada de cinco países.

**Tabla 13.** Criterios microbiológicos para la leche pasturizada de acuerdo con las guías de procesamiento de la leche donada de cinco países.

## XII.7. LISTADO DE ABREVIATURAS

<b>A</b>	L-arginina
<b>AAP</b>	<i>American Academy of Pediatrics</i>
<b>AEBLH</b>	Asociación Española de Bancos de Leche Humana
<b>AEP</b>	Asociación Española de Pediatría
<b>AG</b>	Ácidos Grasos
<b>APPCC</b>	Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico
<b>ARA</b>	<i>Arachidonic acid</i> (Ácido araquidónico)
<b>BLH</b>	Banco de Leche Humana
<b>BRLM</b>	Banco Regional de Leche Materna
<b>BRLMAMGU</b>	Banco Regional de Leche Materna Aladina MGU
<b>C</b>	L-carnitina
<b>CAM</b>	Comunidad Autónoma de Madrid
<b>CIP</b>	<i>Cleaning-In-Place</i> (sistema de limpieza in situ)
<b>CMV</b>	Citomegalovirus
<b>D</b>	Dornic
<b>DAG</b>	Diacilglicérido
<b>DHA</b>	<i>Docosahexanoic acid</i> (ácido docosahexanoico)
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
<b>EFSA</b>	<i>European Food Safety Authority</i> (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria)
<b>EG</b>	Edad Gestacional
<b>EGF</b>	<i>Epidermal Growth Factor</i> (factor de crecimiento epidérmico)
<b>EMBA</b>	<i>European Human Milk Bank Association</i> (Asociación Europea de Bancos de Leche Humana)
<b>ESPGHAN</b>	<i>European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition</i> (Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica).
<b>FIOCRUZ</b>	<i>Fundación Oswaldo Cruz</i>
<b>FTIR</b>	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i> (espectroscopía de infrarrojos con transformada de Fourier)
<b>GC</b>	Cromatografía de gases
<b>G-CSF</b>	<i>Granulocyte Colony Stimulating Factor</i> (factor estimulante de colonias de granulocitos)
<b>GF</b>	<i>Growth factors</i> (factores de crecimiento)
<b>GGTP</b>	Gamma-glutamyl transpeptidasa
<b>HAMLET</b>	<i>Human Alpha-lactalbumin Made LEthal to Tumor cells</i> ( $\alpha$ -lactoalbúmina transformada en letal para las células tumorales)
<b>HC</b>	Hidratos de Carbono
<b>HMBANA</b>	<i>Human Milk Banking Association of North America</i> (Asociación Norteamericana de Bancos de Leche Humana)
<b>HMOs</b>	<i>Human Milk Oligosaccharides</i> (oligosacáridos de leche materna)
<b>HTLV</b>	<i>Human T-Lymphotropic Virus</i> (virus linfotróficos de células T humanas)
<b>HTST</b>	<i>High-Temperature Short-Time</i> (altas temperaturas y tiempos cortos)
<b>IBERBLH</b>	Red Iberoamericana de Bancos de Leche Humana
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<i>Human Interferon Gamma</i> (Interferón gamma)

<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>IHAN</b>	Iniciativa para la <b>H</b> umanización de la <b>A</b> sistencia al <b>N</b> acimiento y la <b>L</b> actancia
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>IMC</b>	Índice de <b>M</b> asa <b>C</b> orporal
<b>IR</b>	Infrarrojo
<b>L</b>	Lactosa
<b>LTLT</b>	<i>Low-Temperature Long-Time</i>
<b>MAG</b>	Monoacilglicérido
<b>MCP-1</b>	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i> (proteína quimiotáctica de monocitos 1)
<b>MHz</b>	Megahercio
<b>MIP-1<math>\beta</math></b>	<i>Macrophage Inflammatory Protein 1<math>\beta</math></i> (proteína inflamatoria de macrófagos)
<b>MPa</b>	Megapascuales
<b>MS</b>	<i>Mass Spectrometry</i> (espectroscopía de masas)
<b>MUFA</b>	<i>Monounsaturated fatty acid</i> (ácido graso monoinsaturado)
<b>N</b>	Nucleótido
<b>NEC</b>	<i>Necrotizing Enterocolitis</i> (enterocolitis necrotizante)
<b>OMS</b>	Organización <b>M</b> undial de la <b>S</b> alud
<b>PATH</b>	<i>Program for Appropriate Technology in Health</i> (Programa para <b>T</b> ecnología apropiada en <b>S</b> alud)
<b>PCA</b>	<i>Principal Component Analysis</i> (análisis de componentes principales)
<b>PFGE</b>	<i>Pulsed field gel electrophoresis</i> (electroforesis por campo de pulso)
<b>PG</b>	Polímeros de glucosa
<b>PHo</b>	Pasteurización <b>H</b> older
<b>PN</b>	<b>P</b> eso al <b>N</b> acimiento
<b>PNIAM</b>	Programa Nacional de <b>I</b> ncentivo al <b>A</b> leitamiento <b>M</b> aterno
<b>PUFA</b>	<i>Polyunsaturated fatty acid</i> (ácidos grasos poliinsaturados)
<b>QPS</b>	<i>Qualified Presumption of Safety</i> (Presunción Cualificada de Seguridad)
<b>RN</b>	Recién Nacido
<b>RMN</b>	Resonancia <b>M</b> agnética <b>N</b> uclear
<b>S</b>	Selenio
<b>SFA</b>	<i>Saturated fatty acid</i> (ácidos grasos saturado)
<b>SGC</b>	Sistema de <b>G</b> estión de la <b>C</b> alidad
<b>SIgA</b>	<i>Secretory Immunoglobulin A</i> (inmunoglobulina A secretora)
<b>SNG</b>	Sonda Naso <b>G</b> ástrica
<b>T</b>	Taurina
<b>TCM</b>	Triglicéridos de <b>C</b> adena <b>M</b> edia
<b>TGA</b>	<i>Triacylglyceride</i> (triacilglicéridos)
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math></i> (factor de crecimiento transformante beta)
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<i>Tumor Necrosis Factor <math>\alpha</math></i> (factor de necrosis tumoral $\alpha$ )
<b>UCINs</b>	Unidades de <b>C</b> uidados <b>I</b> ntensivos <b>N</b> eonatales
<b>UHT</b>	<i>Ultra High Temperature</i> (Tratamiento a temperaturas ultra altas)



<b>UKAMB</b>	<i>United Kingdom Association for Milk Banking</i> (Asociación de Bancos de Leche de Reino Unido)
<b>UNICEF</b>	<i>United Nations International Children's Emergency Fund</i> (Fondo Internacional de Emergencia de las Naciones Unidas para la Infancia)
<b>UPLC-MS/MS</b>	<i>Ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometer</i> (cromatografía líquida de alta resolución acoplada con espectroscopía de masas)
<b>UV</b>	Radiación Ultravioleta
<b>UV-C</b>	Ultravioleta C
<b>VIH</b>	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
<b>VPH</b>	Virus del Papiloma Humano
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i> (Organización Mundial de la Salud)